

TARTU ÜLIKOOL
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
ZOOLOOGIA OSAKOND
TERIOLOOGIA ÕPPETOOL

Maris Pärn

**PÕISTANG-PAELUSSI *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS* SENSU STRICTO
GENEETILINE MITMEKESISUS ARMEENIAS JA TÜRGIS NING
FÜLOGENEETILINE SEOS TEISTE PIIRKONDADEGA**

Magistritöö

Juhendaja:

PhD Urmas Saarma

Tartu 2019

Põistang-paelussi *Echinococcus granulosus* sensu stricto geneetiline mitmekesisus Armeenias ja Türgis ning fülogeneetiline seos teiste piirkondadega

Ülemaailmse levikuga põistang-paeluss *Echinococcus granulosus* sensu stricto (s.s.) põhjustab zoonootilist haigust nimega tsüstiline ehhinokokoos. See zoonoos kujutab ohtu nii kariloomade kui ka inimeste tervisele. *E. granulosus* s.s. jaguneb kaheks üksteisest hästieristuvaks genotüübiks: G1 ja G3.

Antud töös analüüsit põhjalikumalt Türgist ja Armeenias pärit parasiidiproove. Kokku sekveneeriti 85 proovi peaaegu täielikud mitokondriaalse DNA järjestused. Saadud Armeenia (n=38) ja Türgi (n= 47) proovidele lisati fülogeneetiliste enelüüside läbiviimiseks rahvusvahelisest andmebaasist Genbank 211 genotüüpi G1 ja 39 genotüüpi G3 kuuluvat peaaegu täielikku mtDNA järjestust (11 675 aluspaari).

Saadud andmestike põhjal nägime, et Armeenia ja Türgi proovid olid tihedalt seotud teistest piirkondadest pärit proovidega ning mõlema genotüübi puhul võis täheldada alampopulatsioonide vähest geneetilist diferentseerumist. Vähemlevinud genotüübi G3 leviku lähtepunkt asub Bayesi fülogeograafilise analüüsi tulemusena Lähis-Ida piirkonnas.

Genetic diversity and phylogenetic relations of *Echinococcus granulosus* sensu stricto in Armenia and Turkey

Echinococcus granulosus sensu stricto (s.s.) has a worldwide distribution and causes a zoonotic disease called cystic echinococcosis. This zoonosis poses a great threat to both livestock and human health. *E. granulosus* s.s. is divided into two distinct genotypes: G1 and G3.

Present study focused on samples from Armenia and Turkey. Overall 85 of near-complete mitochondrial DNA samples were sequenced. A total of 211 genotype G1 and 39 genotype G3 mtDNA sequences (11,675 bp) sequences from Genbank were added to perform phylogenetic analysis of Armenian (n = 38) and Turkish (n = 47) data.

Based on the resulting data, it can be concluded that the Armenian and Turkish samples of both genotypes were closely related to samples from other regions, and in both cases, low genetic differentiation within subpopulations was observed. Based on Bayesian phylogeographic analysis the origin of the less-prevalent genotype G3 is in the Middle East.

Sisukord

Sissejuhatus	5
1. Põistang-paeluss	7
1.1. Elutsükkel	7
1.2. Genotüübiline jaotuvus	9
1.3. <i>Echinococcus granulosus</i> sensu stricto levik.....	10
1.4. Mitokondriaalne DNA	10
2. Materjal ja meetodid.....	12
2.1. Proovide päritolu.....	12
2.2. DNA eraldamine, mtDNA lookuste amplifitseerimine ja sekveneerimine	12
2.3. Andmeanalüüs	15
2.4. Töö autori roll	16
3. Tulemused	17
3.1. Armeenia ja Türki proovid	17
3.2. Fülogenees laiendatud andmekogumi põhjal.....	19
3.2.1. Genotüübi G1 fülogenees	20
3.2.2. Genotüübi G3 fülogenees	23
3.2.3. Genotüübi G3 levikusuunad	25
4. Arutelu.....	27
Kokkuvõte	29
Summary.....	30
Tänuavaldused	31
Kasutatud kirjandus	32
Lisa 1.	37
Lisa 2	40

Sissejuhatus

Ehhinokokid on väikesed, mõne millimeetri pikkused paelussid, kes on siseparasiitidena tuntud juba antiikajast. Hoolimata pikast ajaloost ning arvukatest ohjamiskatsetest on ehhinokokid ka tänapäeval majanduslikult kulukad ja inimestele ohtlikud.

Ehhinokokkide perekond (*Echinococcus*) kuulub paeluslaste (Taeniidae) sugukonda ning neljanapaliste (Cyclophyllidea) seltsi. Perekonda kuuluvad liigid põhjustavad ohtlikku zoonootilist parasiithaigust ehhinokokoosi (Eckert ja Thompson 2017).

Põistang-paeluss *Echinococcus granulosus* sensu lato on tsüstilise ehhinokokoosi põhjustajana suureks ohuks nii inimeste kui loomade elule ja tervisele. Tsüstilise ehhinokokoosiga kaasnevad ka suured majanduslikud kahjud (Eckert ja Thompson 2017; Otero-Abad ja Torgerson 2013). Tänu ülemaailmsele levikule, kõrgele zoonootilisusele ning laiale peremeesliikide hulgale on tsüstilist ehhinokokoosi nimetatud üheks tõsisemaks inimeste parasiithaiguseks ja Maailma Terviseorganisatsioon on arvanud selle 17-ne olulisema troopilise haiguse hulka. Ta põhjustab ohtu inimeste elule ning tervisele ja läbi kari- ja metsloomade ka suurt majanduslikku kahju (Eckert *et al.* 2001).

Maailmas põeb tsüstilist ehhinokokoosi samaaegselt umbes miljon inimest, see on toiduga levivate parasiithaiguste hulgas nookpaelussi (*Taenia solium*) järel olulisuselt teisel kohal (FAO 2014). Läbi ajaloo on mõningad katsed parasiiti ohjata olnud edukad, kuid selliseid näiteid saab tuua vaid saartelt või väga hõreda inimasustusega aladelt. Probleeme põhjustab see haigus eelkõige vaesemates maapiirkondades Aasias, Aafrikas, aga ka Euroopa lõunaosas Vahemere piirkonna riikides, kus kokkupuude inimeste, kariloomade ja vabalt elavate koerte vahel on tihe (Romig *et al.* 2017).

Põistang-paeluss on keerukas liikide ja genotüüpide kompleks, mille taksonoomia on siiani ebaselge. Ajalooliselt eristati mitokondriaalse DNA põhjal lausa kümmet genotüüpi, vastavalt G1-G10, kuid tänapäeval saame rääkida kaheksast genotüübist, mis jaotuvad 4-6 liigi vahel. Antud töös on käsitusel vaid kõige laiema peremeeste valikuga liik, kuhu kuuluvad genotüübid G1 ja G3 ning mille teaduslik nimi on *Echinococcus granulosus* sensu stricto.

Võttes arvesse parasiidi ülemaailmset levikut ning majanduslikku kahju ja koormust tervishoiusüsteemile, on põistang-paelussi leviku, zoonootilisuse ja genotüübiliste erinevuste väljaselgitamine olulise tähtsusega. Paraku on neis teadmistes lünki veel küllaga. Kas ja kuidas erinevad genotüübid nakatumisvõime poolest ning millised on eri

genotüüpide peamised levikusuunad? Need on vaid mõned vastamata küsimused, mis on olulised paelussi nakkusega võitlemiseks maailma eri piirkondades (Larrieu *et al.* 2015; Kinkar *et al.* 2018a)

Tsüstiline ehhinokokoos on oma olemuselt ennetatav haigus ning inimtervise seisukohalt on oluline erinevates piirkondades levivate genotüüpide kindlakstegemine ja levikumustrite uurimine. Olenevalt genotüübist võivad peremehespetsiifilisus, elutsüklimustrid ja haiguse kulgemise kiirus erineda. Samuti pole teada, kas ja kuidas mõjuvad väljatöötatud vaktsiinid erinevatele genotüüpidele.

Antud töös analüüsin põhjalikumalt nii Türgist kui ka Armeenias pärit proove. Kui Türgist on peaaegu täieliku mitogenoomi põhjal põistang-paelussi fülogeograafiat varem uuritud, siis antud töö on esimene, mis kaasab Armeenias pärit proovide mitokondri genoomi. Lähis-Ida, kui paljude kariloomade kodustamise piirkonda on peetud põistang-paelussi leviku alguspunktiks ning seetõttu võib eeldada piirkonnas parasiidi suuremat geneetilist mitmekesisust. Antud töös uurin, kui palju erineb Armeenia ja Türki populatsioonide geneetiline struktuur võrreldes ülejäänud maailmaga ning kui tugevalt eristub Armeenia kui piirkonna populatsiooni struktuur muust maailmast.

Töö hüpoteesid:

- 1) Armeenias pärit proovid moodustavad fülogeneetiliselt eristatava grupi.
- 2) Geneetiliselt on Türki ja Armeenia isendid lähedasemad neile geograafiliselt lähemal asuvatest piirkondadest pärit isenditega.
- 3) Genotüübi G3 puhul on Türki üks parasiidi leviku alguspunkte.

1. Põistang-paeluss

Põistang-paelussidel on terve rida unikaalseid tunnuseid ja omadusi, mille põhjal saab neid hõlpsasti eristada teistest samasse sugukonda Taeniidae kuuluvatest liikidest. Täiskasvanud põistang-paeluss on ainult mõne millimeetri pikkune ning harva küündib pikkus üle 7mm. Nende keha koosneb mitte rohkem kui kuuest lülist, kusjuures mitmetel teistel sugukonna Taeniidae liikidel on üle tuhande lüli ning nad võivad kasvada mitme meetri pikkuseks. Paelussidele kohaselt ei ole põistang-paelussil kehasisest seedeelundkonda ning ainevahetus toimub keha välispinna kaudu (Eckert *et al.* 2001).

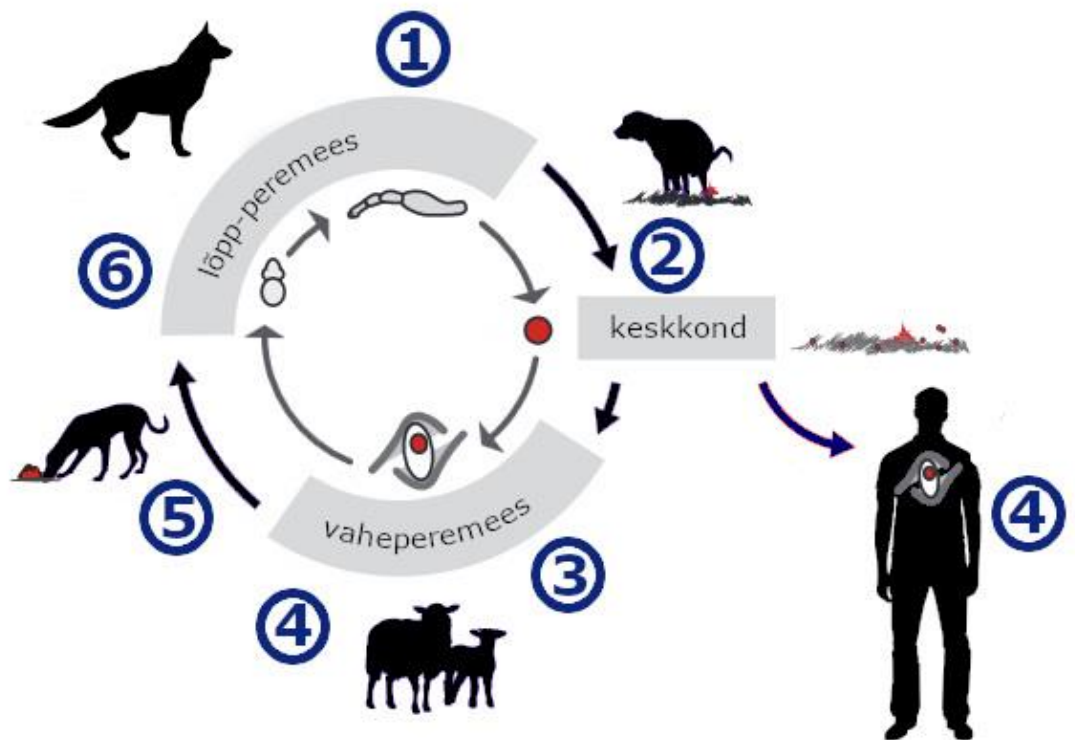
Täiskasvanud isend elab kinnitununa lõpp-peremehe peensoole limaskestast hattudele ning on hermafrodiitne. Kinnitumiseks paiknevad tal päisel neli iminappa ning kaks rida nookusid. Paljunemine toimub suguliselt, eelistatud on sugurakkude vahetus, kuid hõredama levialaga piirkondades on tavalisem enese viljastamine (Thompson 2017). Viimane kehalüli sisaldab sadu mune ning eraldub küpsena stroobilast ning satub läbi peremehe seedesüsteemi väliskeskkonda. Munad võivad väliskeskkonnas nakkusohtlikuna püsida kuid või sobivates oludes isegi aastaid (Eckert *et al.* 2001; Thevenet *et al.* 2005).

1.1. Elutsüklid

Põistang-paeluss vajab elutsükli läbimiseks kahte peremeest: lõpp-peremeest, kelleks võivad olla erinevad koerlased ning herbivoorset vaheperemeest (Joonis 1), kelleks on tihti kariloomad või sõralised (McManus *et al.* 2003).

Parasiit suudab nakatada suurt hulka erinevaid peremeesliike. Tal on olemas nii metsloomi kui ka koduloomi hõlmav elutsüklid ning teatud juhtudel võivad need tsüklid olla omavahel põimunud. Metsloomi hõlmav tsüklid on eelkõige levinud hõreda inimasustusega aladel. Näiteks toimub metsloomatsüklid Põhja- Ameerikas huntide ja põhjapõtrade vahel (Moro ja Schantz 2006). Austraalias on aga vaheperemeesteks kukrulisid nagu näiteks erinevad kangurud ning lõpp-peremeesteks dingod. Sealne koduloomatsüklid hõlmab koeri ja kariloomi. Pole harvad juhud, kui parasiit kandub metsloomadelt üle koduloomadele. See teeb aga kodulooma tsükli ohjamise keerulisemaks (Jenkins 2006). Enamasti hõlmabki parasiidi elutsüklid koeri ning kariloomi. Vaheperemeheks võivad olla erinevad kariloomad: lambad, kaamelid, sead, hobused, alpakad, kitsed jt. (Romig *et al.* 2017).

Vaheperemees saab nakkuse keskkonnast, neelates alla paelussi mune. Paelussi munadest väljub esimese kasvujärgu vastne- onkosfäär, kes liigub läbi vaheperemehe peensoole seina tema vereringesse. Sealt kandub ta edasi suurematesse organitesse nagu kopsud või maks. Jõudnud sobiva organini kinnitub ta nookudega siseorgani seina külge ning temast hakkab arenema ehhinokokipõis (McManus *et al.* 2003). Ehhinokokipõie asukoht, arenemiskiirus ja kuju võib olla erinevatel põistang-paelussi genotüüpidel erinev (Thompson 2017).



Joonis 1. Põistang-paelussi elutsükel. 1) Täiskasvanud uss elab lõpp-peremehe peensoole seinale kinnitunult. Valmivad mune täis kehalülid. 2) Väljaheidetega satuvad munad keskkonda. 3) Vaheperemees neelab munad alla, hakkab arenema onkosfäär. 4) Põistangu nakatava vastsejärgu arenemine erinevates organites (kopsud, maks). 5) Vaheperemehe siseelundite tarbimine lõpp-peremehe poolt. 6) Looteline päis vabaneb põistangust ja kinnitub peensoole seinale.

Ehhinokokipõis on vedelikuga täidetud struktuur, milles arenevad tuhanded protoskooleksid ehk paelussi nakkusvõimelised päised. Iga protoskooleks on võimeline nakatama peremeesorganismi. Elutsükli jätkumiseks on vajalik vaheperemehe siseorganite tarbimine lõpp-peremehe poolt. Protoskooleksid liiguvad peremehe peensoolde ning arenevad seal täiskasvanud isendiks (Eckert *et al.* 2001; Thompson 2017).

Parasiidi elutsükli jätkumiseks vajalikku kiskja- saaklooma suhet inimese puhul ei toimu ning seetõttu nimetatakse inimest tupikperemeheks. Inimene saab tavaliselt nakkuse kokkupuutel koertega. Parasiidi munad võivad kinnituda koerte karvade külge ning inimene võib neid tahtmatult alla neelata. Suur osa nakatumisi kulgeb aga asümptomaatilisel (Eckert *et al.* 2001; Deplazes *et al.* 2017).

1.2. Genotüübiline jaotuvus

Echinococcus granulosus sensu lato on keerukas kompleks, kuhu kuulub kaheksa genotüüpi, mis jaotuvad 4-6 eri liigi vahel, sõltuvalt käsitlesest (Laurimäe 2018). Nii liigid kui genotüübid erinevad üksteisest geneetiliselt, aga ka leviku, peremehevaliku, osaliselt ka morfoloogia, patogeensuse ja inimeste nakatamisvõime poolest (Eckert *et al.* 2001; Thompson ja McManus 2002; Romig *et al.* 2017). Täpne liigiline määratlus seisneb nende puhul veel ees ja see on olulise tähtsusega nii teaduslikult kui ka praktilisel, võimaldades meedikutel ja veterinaaridel üheselt aru saada, millise taksoniga on tegu.

Kui algselt eristati liike ja genotüüpe morfoloogia ja peremeesliikide kaudu, siis tänapäeval on kasutusel nii tuuma- kui ka mitokondri genoomijärjestused. Algselt eristati kümme genotüüpi, kuid genotüüpi G9 ei peeta enam kehtivaks ning G2 arvatakse olevat G3-e variant (Scott *et al.* 1997; Thompson ja McManus 2002; Laurimäe 2018)

Erinevad genotüübid jaotuvad liikide vahel järgmiselt: *E. granulosus* s.s. (G1 ja G3), *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5), kuid genotüüpide G6, G7, G8 ja G10 staatus on ebaselge. Viimased uuringud on näidanud, et nii G6/G7 kui G8/G10 moodustavad fülogeneetiliselt kaks eraldi klastrit (Laurimäe 2018). Genotüüpide G6/G7 jaoks on välja pakutud nimi *E. intermedius*, kuid see ei ole paraku sobiv nimi, kuna artiklis, kus oli toodud *E. intermedius* mõõtmised (Lopez-Neyra ja Soler Planas 1943), ei sobi need G6/G7 mõõtmega, vaid

hoopis *E. granulosus* s.s. omadega (Saarma *et al.*, avaldamata andmed). Genotüüpidele G8/G10 sobib nimi *E. canadensis* (Laurimäe 2018).

1.3. *Echinococcus granulosus* sensu stricto levik

Põistang-paelussi genotüüpidest on *Echinococcus granulosus* sensu stricto kõige laiemalt levinud ning 88% tsüstilise ehhinokokoosi juhtudest on olnud põhjustatud just selle liigi poolt (Alvarez Rojas *et al.* 2014). Samuti on tema teadaolevate vaheperemeeste nimekirjas kõige rohkem erinevaid loomaliike alustades kukrulistest ning kaamelilistest ning lõpetades erinevate kodustatud ja metsikute sõralistega. Levinuimad on siiski lambad, veised, kitsed, sead ja pühvlid. Samuti võib lõpp-peremeheks olla mitmeid erinevaid koerlasi nagu näiteks hundid, koerad, šaakalid või dingod (Romig *et al.* 2017). G3 on olnud tuntud ka kui pühvli-tüvi, kuna algselt leiti seda Indias vesipühvlitelt, kuid hiljem on seda tuvastatud ka paljudelt teistelt kariloomadelt ning parasiit võib algselt pärit olla hoopis Lähis-Ida piirkonnast (Kinkar *et al.* 2018b). Seega kattuvad nii G3 kui ka G1 peremeeste loetelud suhteliselt suures ulatuses. G1 on nimetatud ka lamba tüveks, kuid ta on maailmas palju laiemalt levinud ning on erinevate peremeesliikide arvult kindlal esikohal (Thompson 2017).

Üks suuremaid leviku keskpunkte on nii genotüübi G1 kui ka G3 puhul Lähis-Ida (Kinkar *et al.* 2018a; 2018b). Lähis-Ida on tuntud paljude kariloomade nagu näiteks lamba, kitse ja veise kodustamispiirkonnana. Ning antud liigid on väga olulised parasiidi vaheperemehed. Tänapäeval on G1 levinud kõikjal maailmas, eriti Aafrikas, Austraalias, Lõuna-Euroopas, Lõuna-Ameerikas ning Aasias (Kinkar *et al.* 2018a). Levikule on kaasa aidanud aktiivne loomakaubandus erinevate riikide ja maailmajagude vahel (Kinkar *et al.* 2016, 2018a; Yanagida *et al.* 2012).

1.4. Mitokondriaalne DNA

Algselt eristati liike nende morfoloogia ja peremeesliikide järgi, kuid teaduse arenedes muutusid liikide eristamiseks valdavaks just molekulaarsed meetodid, mis paljuskord toetasid algselt eristatud gruppe (Thompson 2017). Peatselt hakati erinevaid tüvesid ning genotüüpe eristama kasutades mitokondriaalset DNA-d, täpsemalt COXI ja NADH1 geene (Bowles *et al.* 1992; Bowles ja Mcmanus 1993).

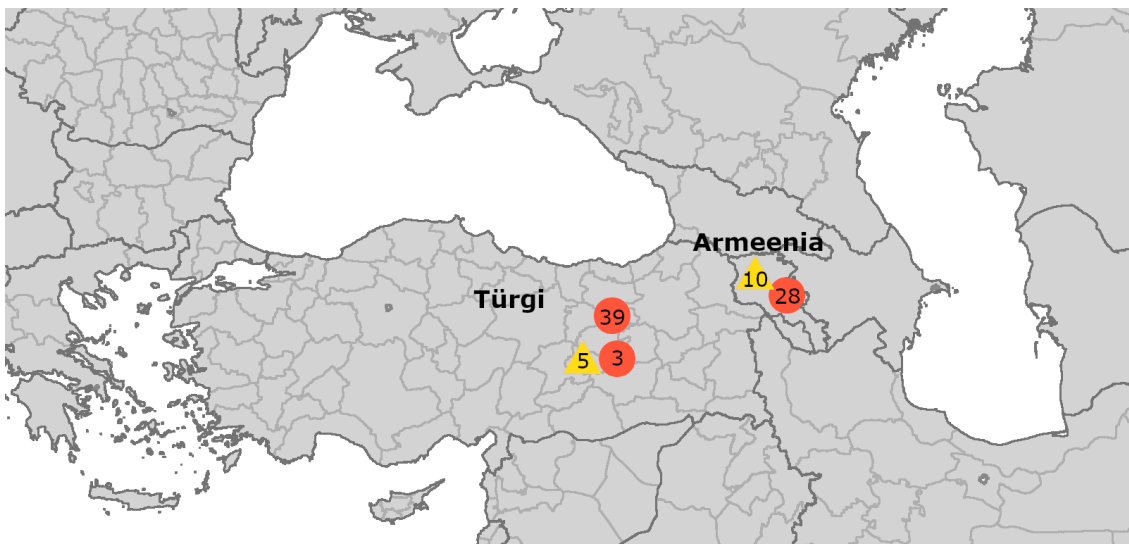
Põistang-paelussi mitokondri täisgenoom on võrreldes tuumagenoomiga oluliselt väiksem, varieerudes sõltuvalt genotüübist 13,5 ja 17,7 tuhande aluspaari vahel (Kinkar *et al.* 2019). Mitokondriaalne DNA reeglina ei rekombineeru ning pärandatakse täies ulatuses emaliini pidi. Samas koguneb genoomi aja jooksul mutatsioone ja et mitogenoome võib rakus leiduda paljudes kordustes, siis kasutatakse seda sageli geneetilise mitmekesisuse, fülogeneesi ja fülogeograafia uuringutes (Castro *et al.* 1998).

2. Materjal ja meetodid

2.1. Proovide päritolu

Antud töö raames analüüsiti 85 parasiidiproovi, millest 47 olid pärit Türgist ning 38 Armeenias (Joonis 2). Türki proovid pärinesid kahest Türki regioonist- Elazigist ja Erzincanist. Armeenia koeproovid olid kogutud koostööpartnerite poolt erinevatest Armeenia piirkondadest.

Lisaks koostati fülogeneesi uurimiseks ning teiste maailma piirkondadega võrdlemiseks laiendatud andmekogum, kuhu lisati meie töörühma poolt varem publitseeritud 211 G1 järjestust ning 39 G3 järjestust (Kinkar *et al.* 2018a; Kinkar *et al.* 2018b; Lisa 2).



Joonis 2. Proovide päritolu. Türki proovidest 39 olid kogutud Erzincani regioonist ning 8 Elazigist, kusjuures viie puhul oli peremeheks inimene. Armeenias oli kokku 38 proovi, millest kümne puhul oli peremeheks inimene.

2.2. DNA eraldamine, mtDNA lookuste amplifitseerimine ja sekveneerimine

Türki proovid jõudsid koostööpartneritelt Tartusse juba eraldatud DNA kujul.

Armeenias pärit koeproovidest eraldati DNA HighPure PCR Template Preparation Kitiga (Roche Diagnostics) vastavalt etteantud protokollile.

Mitokondriaalse DNA amplifitseerimiseks kasutati töörühmas eelnevalt välja töötatud 12 praimeripaari (Kinkar *et al.* 2017).

Tabel 1. *Echinococcus granulosus* sensu stricto mtDNA eri lookuste PCRil ja sekveneerimisel kasutatud praimerid (täiendatud versioon võrreldes Kinkar *et al.* 2017).

*Pramereid S7f ja S11f kasutati ainult sekveneerimisel (lisapraimeritena).

Praimer	Praimeri järjestus	Praimeri positsioon	PCR produkt
Ef1	TCGTTTTACACGCGATTGAACT	4924...4945	
Er1	ACCTGCTATGCAGCCCTATT	6147...6166	1243 bp
E2fn	GATGCTGTAACTTCAAGAAATG	6034...6056	
E2r2	CTCAAAGCATTCAAACGC	7053...7070	1037 bp
E3fn	GTTGATTCGTGTTAATTTTTTGGAG	6873...6897	
E3rn	GAAAACATAGCAAACAACAACCC	7573...7595	723 bp
E4f2	GTGATCCTATTTTATTTC AAC	7436...7456	
E4rn	GCTACCTTTGCACAGTCAATATAC	8939...8962	1527 bp
E5fn	GGTACCTAGTTTTTGTATATTGT	8712...8735	
E5rn	GAATCGCTCACTGCCAAACCA	9813...9833	1122 bp
E6f	TAAGGGTGATGCAATTTGAG	9588...9607	
E6r	ACAACCATCTACAGCACGAA	10 812...10 831	1244 bp
E7fn	GATGCTGTTCTTGGTCGTCTTAATC	10 623...10 647	
E7rn	CAATCAACTTCAACAACATAAACC	11 992...12 015	1393 bp
S7f*	GTGTCGGTGTTTAGTCCTAATAG	11 053...11 076	
E8fn	GCTTATGTTACGGCCATAAGA	11,716...11 736	
E8rn	TGCTTAGTAAAAAACACCCCA	12 764...12 784	1069 bp
E10f	GATTACTGTTACTGGTTTTCA	312...332	
E10r	CAACTTAAAAACAAGCATCATCA	1756...1778	1467 bp
E11f	TTTTATGCTATTCTTCGGTGTA	1521...1542	
E11r	CAAAAACACCTCATTAACCAC	3278...3299	1779 bp

S11f*	GGTGCTAATTTTAGGTTTGTATAGACA	2188...2215	
E12f	TTGTGGTGTTTTTATGATG	2922...2940	
E12r	CACAGACGATAACCCAGA	4204...4221	1300 bp
E13f	CGGGTCTTTTATTTTGATGTTG	4003...4024	
E13r	GATCCAAAAGCACATCGA	5507...5524	1522 bp

PCR viidi läbi Advantage 2 polümeraasi seguga, lõppmahuga 20 µl ning see sisaldas 10XP Advantage 2 PCR puhvrit, 0,2 mM dNTPde segu, 0,25µM vastavat praimerisegu ning 1U Advantage 2 polümeraasi. Segule lisati ka 20-50 ng puhastatud DNA-d.

Kasutati touchdown PCR programmi, mille tingimusteks olid:

95 °C 1 minut

95 °C 20 sekundit

55 °C 45 sekundit -0,5 °C iga tsükli kohta, 10 tsükli

68 °C 2 minutit

95 °C 20 sekundit

50 °C 45 sekundit 25 tsükli

68 °C 2 minutit

68 °C 2 minutit

5 °C paus

PCR produktist 10µl puhastati, lisades sellele 1µl puhastussegu. Segu koosnes aluselisest fosfaadist FastAP (1U/µl, Thermo Fisher Scientific) ja eksonukleasist EXO I (20U/µl, Thermo Fisher Scientific). Mõlema lõppkonsentratsioon segus oli 1U/µl.

Puhastusreaktsiooni tingimusteks olid:

37 °C 30 minutit

80 °C 15 minutit

4 °C paus

PCR produkti olemasolu kontrolliti geelelektroforeesil 1xTAE puhvris, agarosgeelile lisati DNA visualiseerimiseks 7µl etiidiumbromiidi (10mg/ml, lõppkonsentratsioon 1,4µg/ml). Molekulmassi markeriks oli O'GeneRuler 1kb Plus (Fermentas) ning geeliplaat pildistati üles ultravioletvalguses.

Puhastatud proovid saadeti sekveneerimiseks Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse.

2.3. Andmeanalüüs

Kõik 85 konsensusjärjestust pandi kokku programmiga CodonCode Aligner v. 8.0.2 (Internet 1) ning parandati ja joondati käsitsi programmiga BioEdit v. 7.2.5 (Hall 1999).

Et võrrelda Armeenias ja Türgist pärit *E. granulosus* s.s. isolaate teiste maailma piirkondadega, koostasid nii genotüübi G1 kui ka G3 kohta eraldi laiendatud andmekogumid kuhu kaasasin lisaks veel 211 G1 (Kinkar *et al.* 2018a) ja 39 G3 (Kinkar *et al.* 2018b) mitogenoomi homoloogilist järjestust (Lisa 2).

Populatsiooniindeksid, nagu näiteks haplotüüpide ja nukleotiidide mitmekesisus, arvutati programmi DnaSp v5.10.01 (Rozas 2009) abil. Programmi Network v. 5.0.1.1 (Bandelt *et al.* 1999) kasutati fülogeneetiliste võrgustike koostamisel ühendatud mediaanide meetodil.

Parima evolutsioonilise mudeli leidmiseks kasutati programmi PartitionFinder 2.1.1 (Lanfear *et al.* 2012, 2017). Bayesi fülogeneetiline analüüs viidi läbi programmidega BEAST 1.8.4 ja BEAUti v.1.8.4 (Suchard *et al.* 2018). Aposterioorsed tõenäosused hinnati MCMC (Markov Chain Monte Carlo) meetodi abil (10 miljonit iteratsiooni, valimisse kaasati iga 1000 seisund), saadud logifaile analüüsiti programmiga Tracer v1.6 (Rambaut *et al.* 2018). Puu loomiseks viidi läbi kolm sõltumatut katset ning selle

kuvamiseks kasutati programme TreeAnnotator v.1.8.4 (Drummond ja Rambaut 2007; Suchard *et al.* 2018) ning FigTree v.1.4.3 (Internet 2).

Bayesi fülogeograafilise analüüsi (Lemey *et al.* 2009) jaoks G3 andmestikule kohandati BeEAUtis faili vastavalt kodulehel asuvale õpetusele fülogeograafilise leviku kohta diskreetses ruumis (Internet 3). Analüüs teostati BEAST 1.8.4.-ga kasutades BEAGLE teeki (Suchard ja Rambaut 2009; Ayres *et al.* 2012). MCMC ahelaid jooksub 30 miljonit iteratsiooni, valim moodustus igast 3000ndast seisundist. Bayesi faktoritega kaart visualiseeriti kasutades programmi Spred3 1.0.7. (Guindon *et al.* 2010; Bielejec *et al.* 2011, 2016).

2.4. Töö autori roll

Töö autor viis kõik magistritöö osad läbi iseseisvalt, välja arvatud Armeenia proovidest DNA puhastamise ning PCR-i praimeripaariga E11f ja E11r, mis viidi läbi koostöös välistudengi Hripsime Atoyaniga.

3. Tulemused

Töö tulemusena koostati edukalt *Echinococcus granulosus* sensu stricto 85 uut peaaegu täielikku mitokondri genoomi järjestust kogupikkusega 12 319 aluspaari.

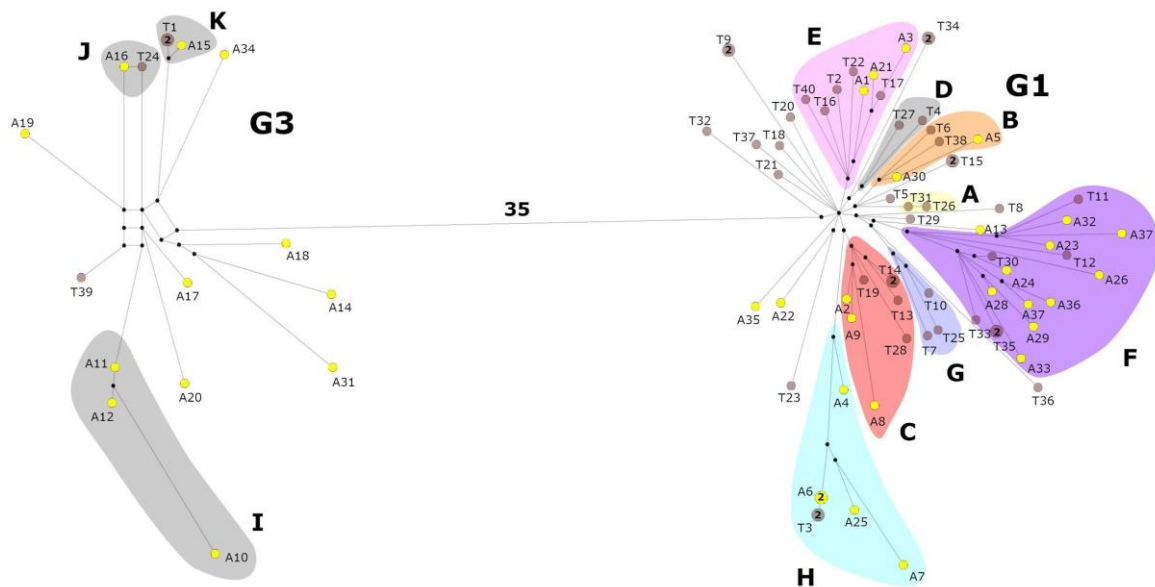
3.1. Armeenia ja Türgi proovid

Türgi ja Armeenia proovid jagunesid võrgustikus kahte suuremasse klaadi (Joonis 3). Suuremasse klaadi kuulub 69 järjestust, mis moodustavad 62 haplotüüpi ning nad kuuluvad kõik genotüüpi G1. Väiksemasse klaadi kuulub 16 järjestust, mis moodustavad 15 haplotüüpi ning kuuluvad genotüüpi G3. Türgi proove oli kokku 47 ning nendest 43 kuulusid genotüüpi G1 ja 4 genotüüpi G3. Armeenias pärit proove oli kokku 38 ning nendest kuulus genotüüpi G1 26 proovi ja genotüüpi G3 12 proovi. Mitokondriaalse DNA põhjal eristuvad genotüübid üksteisest selgelt ning erinevad üksteisest 35 mutatsiooni võrra.

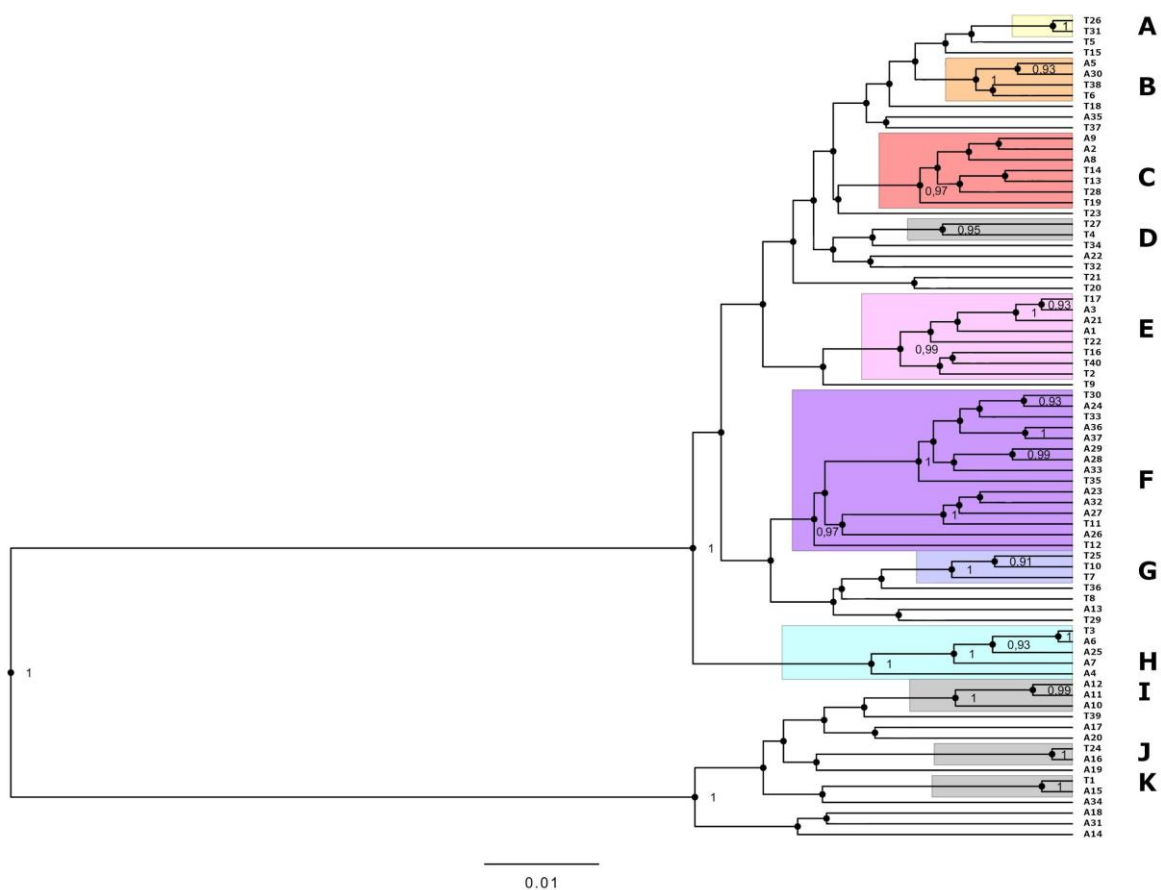
Kõige sobivamaks evolutsiooniliseks mudeliks osutus Armeenia ja Türgi proovide puhul mudel GTR + I+ G (GTR – general time-reversible) (Gu *et al.* 1995). Fülogeneesipuu loomiseks valiti neutraalse molekulaarse kella mudel.

Haplotüüpide mitmekesisus antud proovide hulgas oli kõrge ($H_d \approx 0,998$). Genotüüp G1 proovide hulgast tuli välja kaheksa hästi toetatud (aposterioorne tõenäosus $>0,90$) monofüleetilist haplogruppi (Joonis 4). Kusjuures mitme klaadi puhul oli aposterioorne tõenäosus eriti kõrge ($=1$). G3 puhul oli hästi toetatud haplogruppe kolm. Haplogrupid koosnevad enamasti nii Türgist kui ka Armeenias pärit proovidest, välja arvatud haplogrupp I, kuhu kuulub ainult 3 Armeenia G3 proovi ning haplogrupid A, D ja G, mis koosnevad ainult kahest kuni kolmest Türgi G1 proovist. Suuremate ($n>3$) kladide puhul geograafilist eristumist ei toimunud.

Haplotüüpide mitmekesisus antud proovide hulgas on $H_d \approx 0,998$ (s.d. $\pm 0,002$). Nukleotiidide mitmekesisus (π) oli 0,00238 (s.d. $\pm 0,00018$). Neutraalsusindeksitest Tajima D ja Fu olid negatiivsed ja mõlemad olid ka statistiliselt olulised. ($D = -2,130$, $p < 0,05$; $F_s = -44,59$, $p < 0,02$).



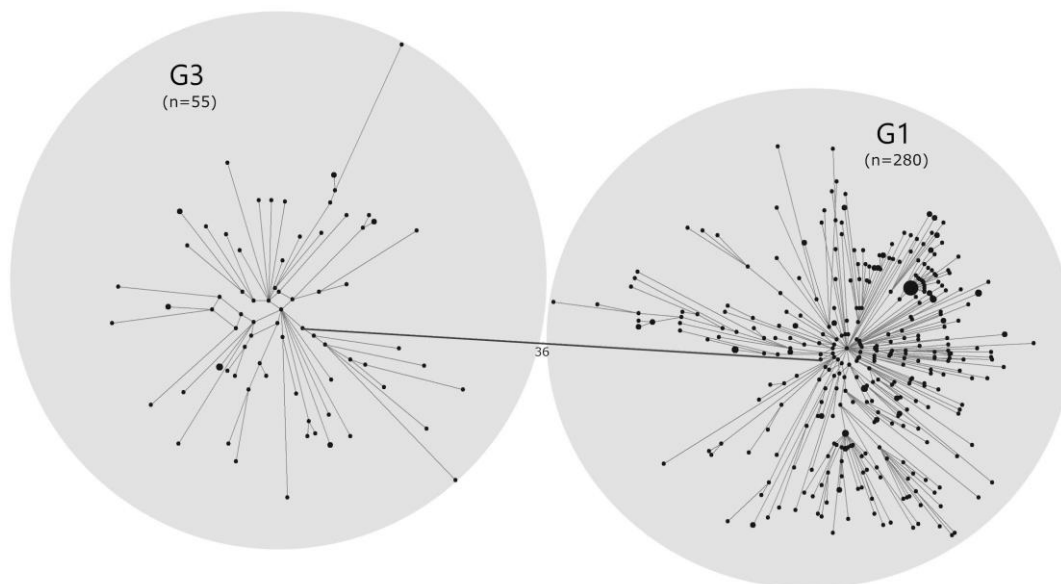
Joonis 3. Türgi ja Armeenia päritolu *Echinococcus granulosus* sensu stricto G1 (n=69) ja G3 (n=16) isolaatide fülogeneetiline võrgustik. Kollasega on märgitud Armeenias ja pruuniga Türgist pärit proovid. Väikesed mustad ringid tähistavad mediaanvektorite asukohti. Number klaadide vahel näitab genotüüp G3 ja G1 vahelist mutatsioonide arvu. Erinevate värvidega on märgitud aposterioorse tõenäosusega >0,90 eristuvad klaadid.



Joonis 4. Türgi ja Armeenia *Echinococcus sensu stricto* G1 (n=69) ja G3 (n=16) pisolaatide fülogeneesipuu. Värviliselt on ära märgitud klaadid, mille aposterioorne tõenäosus > 0,90. Haplotüüpide nimekirja vaata Lisa 1.

3.2. Fülogenees laiendatud andmekogumi põhjal

Kokku kasutasin analüüsides 335 *E. granulosus* s.s. osalise mitokondriaalse DNA järjestust, mis olid 11 675 aluspaari pikad (Lisa 2). Sekveneeritud 69 G1 järjestusele lisasin 211 mtDNA järjestust, mis on pärit tööst Kinkar *et al.* (2018a), kus jälgiti genotüübi globaalseid levikumustreid. Genotüüp G3 lõplik laiendatud andmekogum sisaldas 16 minu sekveneeritud järjestust ning 39 mtDNA järjestust artiklist Kinkar *et al.* (2018b), kus uuriti G3 mitmekesisust ja fülogeograafiat. Koostatud ülevaatelises võrgustikus on eristatavad kaks suurt haplogruppi, mis on üksteisest eraldatud 36 mutatsiooniga (Joonis 5).



Joonis 5. *E. granulosus* s.s. fülogeneetiline võrgustik (n=335), mis hõlmab nii genotüüpi G1 (n=280) kui ka G3 (n=55).

3.2.1. Genotüübi G1 fülogenees

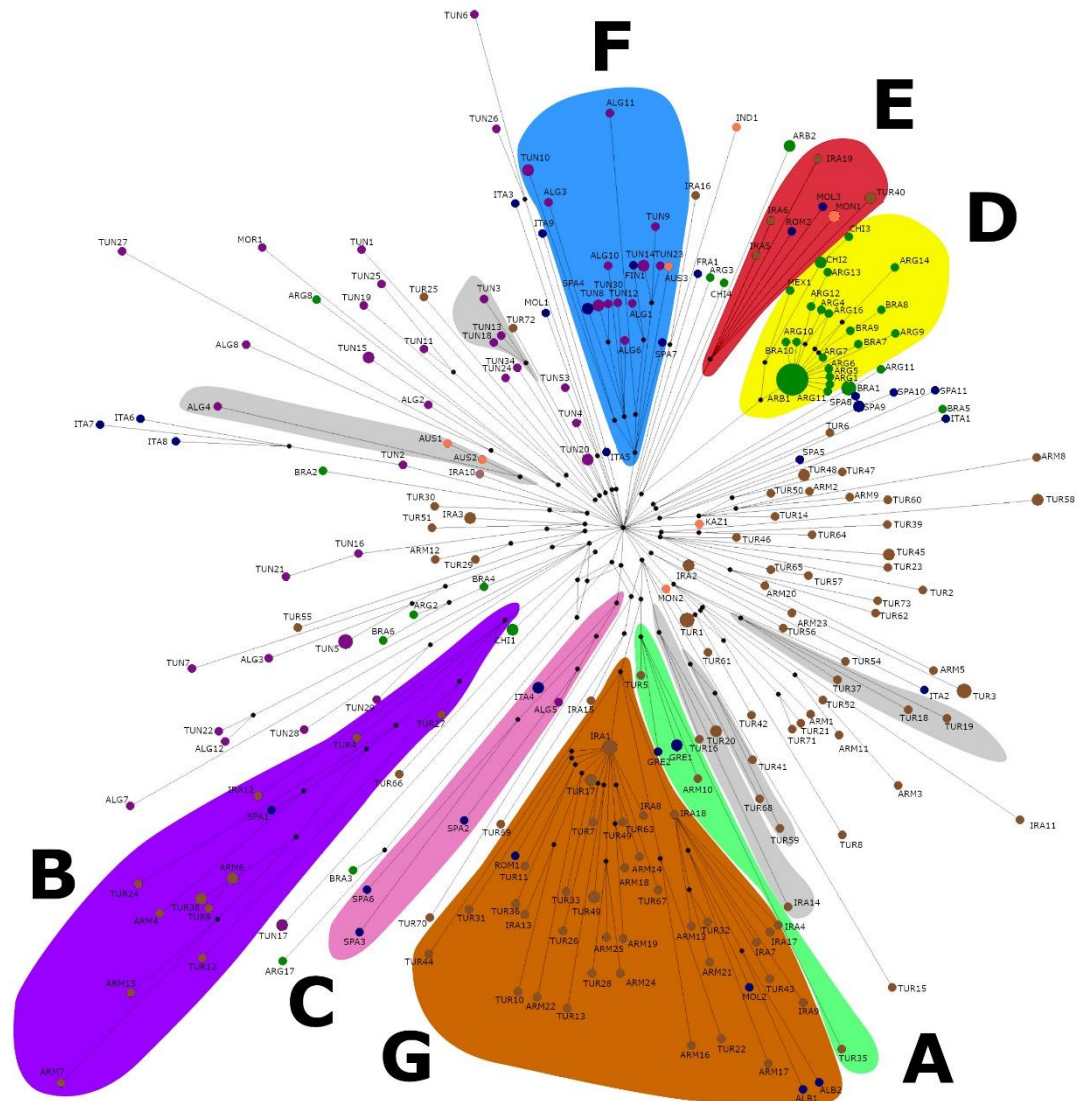
Genotüüp G1 on ülemaailmse levikuga ning antud andmed on pärit viielt mandrilt, kuigi Euraasia ja eriti Lähis-Ida on väga tugevalt esindatud. 280 järjestust jaotusid 232 haplotüüpi. 201 proovi moodustasid eraldi haplotüübid, 25 haplotüüpi sisaldas kahte proovi, 5 haplotüüpi sisaldas kolme proovi ja üks haplotüüp sisaldas lausa 14 proovi (Joonis 7).

Kõige sobivamaks evolutsiooniliseks mudeliks osutus genotüübi G1 andmestiku puhul mudel GTR + I+ G (Gu *et al.* 1995). Fülogeneesipuu loomiseks valiti neutraalse molekulaarse kella mudel.

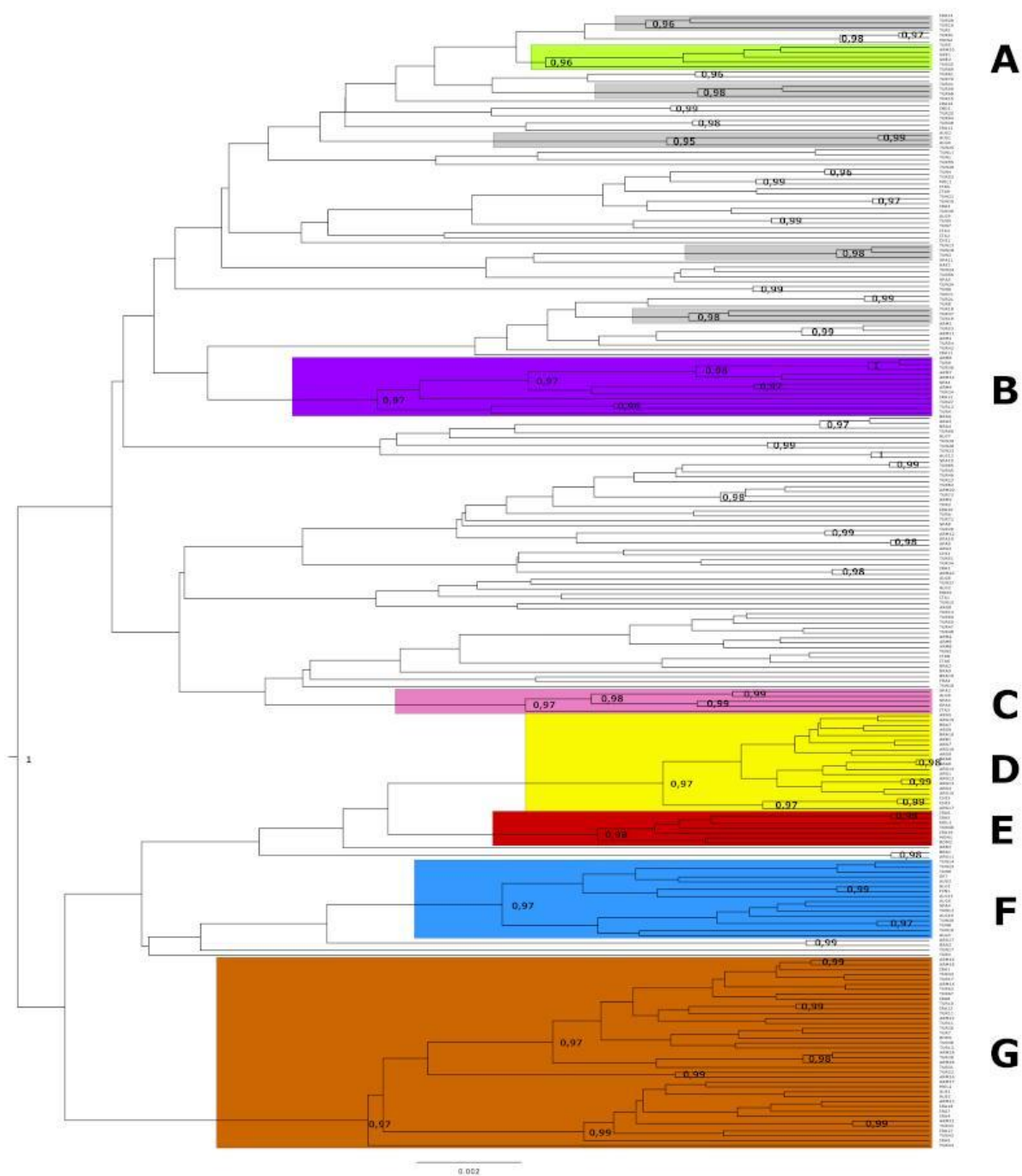
Antud monofüleetilistest klaadidest moodustusid mõned geograafiliselt lähedastest haplotüüpidest, näiteks kolmest Tuneesiast pärit haplotüübist või kaks gruppi, mis sisaldasid vaid Türgist pärit haplotüüpe (Joonis 6). Fülogeneetilisel võrgustikul on need märgistatud halli värviga. Klaad D koosneb vaid Lõuna-Ameerikast pärit proovidest ning klaad G suuremas osas Lähis-Ida piirkonna proovidest, kuid viimases on ka paar haplotüüpi, mis on pärit lähedasmatest Euroopa riikidest nagu Rumeenia, Moldova ja Albaania. Sellesse klaadi kuulub ka osa lisatud Armeenia ja Türgi proovidest, mis koos Iraani proovidega moodustavad klaadist põhiosa.

Klaad F koosneb geograafiliselt kõige kaugematest piirkondadest pärit haplotüüpidest, sisaldades haplotüüpe nii Aafrikast, Euroopast kui ka Austraaliast. Klaad B sisaldas lisaks Iraani, Türgi ja Armeenia proovidele ka ühte Hispaaniast pärit haplotüüpi (SPA1).

Haplotüüpide mitmekesisus genotüübis on suhteliselt kõrge $H_d \approx 0,997$ (s.d. $\pm 0,001$). Nukleotiidide mitmekesisus (π) oli 0,00135 (s.d. $\pm 0,00003$). Neutraalsusindeksitest Tajima D ja Fu olid negatiivsed ja mõlemad olid ka statistiliselt olulised. ($D = -2,779$, $p < 0,001$; $F_s = -353,91$, $p < 0,02$).



Joonis 6. *Echinococcus granulosus* sensu stricto genotüübi G1 fülogeneetiline võrgustik (n=280). Värviliselt on märgitud klaadid, mille aposterioorne tõenäosus Bayesi analüüsil oli $>0,95$ ning mis sisaldasid 5 või rohkem haplotüüpi (vt. Joonis 7). Halliga märgitud klaadide aposterioorne tõenäosus on samuti $>0,95$ ning need sisaldavad kolm kuni viis haplotüüpi.



Joonis 7. *Echinococcus granulosus sensu stricto* genotüübi G1 288 proovi põhjal koostatud Bayesi fülogeneetiline puu. Värviliselt on ära toodud seitse klaadi (A-G), mille aposterioorne tõenäosus $>0,95$ ning mis sisaldasid viit või enamat haplotüüpi.

3.2.2. Genotüübi G3 fülogenees

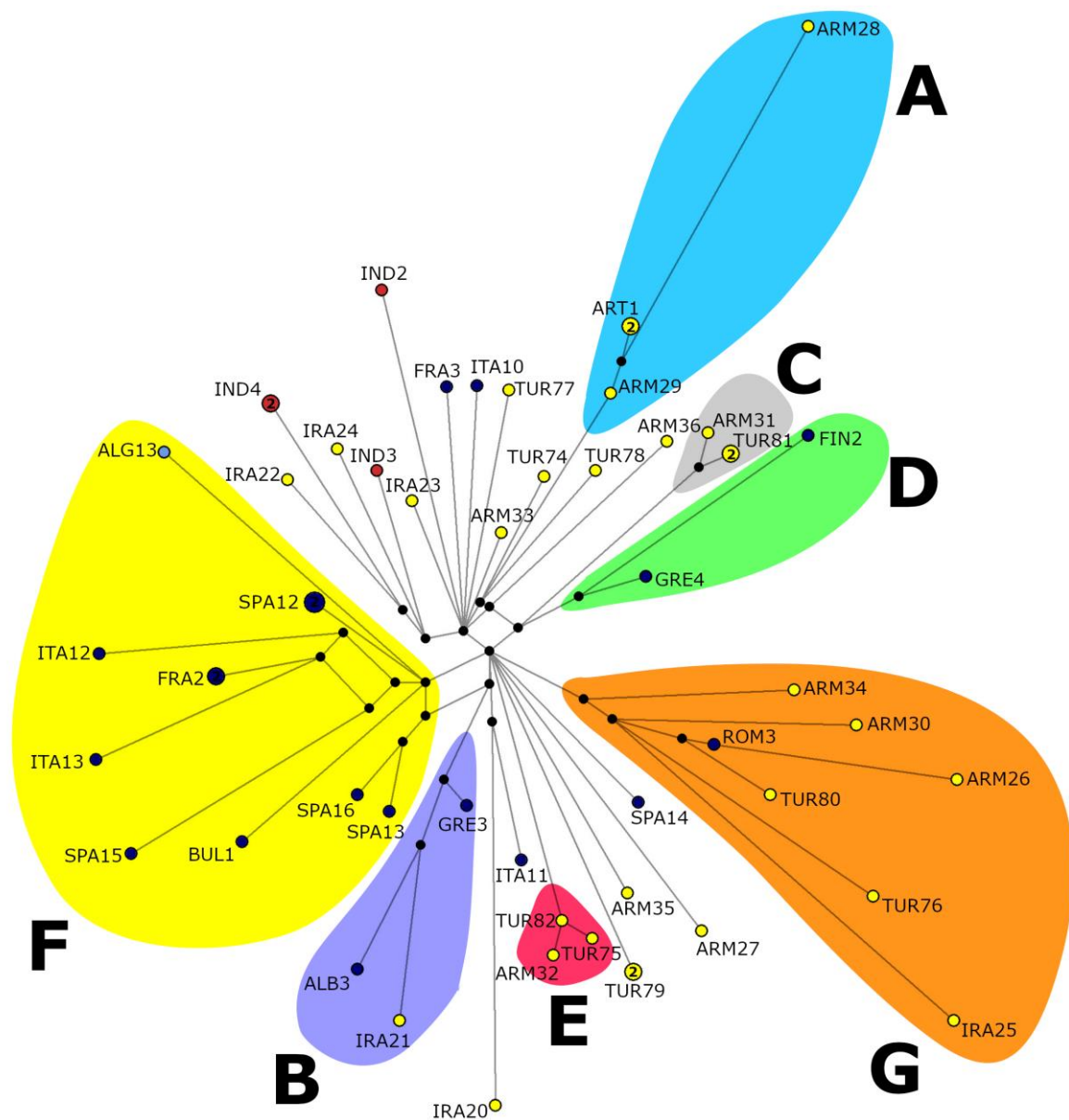
Tänu esinemissageduste erinevusele on G3 mitogenoomi järjestusi G1st tunduvalt vähem. Seega moodustavad sekveneeritud 16 järjestust peaaegu kolmandiku laiendatud andmekogust. Kokku tuli valimi suuruseks 55 genotüübi järjestust, mis jagunesid 48 haplotüüpi. 42 haplotüüpi sisaldas vaid ühte järjestust, 5 haplotüüpi sisaldas kahte proovi (FRA2; ART1; TUR79; IND4; TUR81) ning SPA12 sisaldas kolme. Bayesi tõepära meetodil sai kõrge ($>0,90$) esinemise tõepära seitse haplogruppi (Joonis 9) ning need on erinevate värvidega ära toodud ka fülogeneetilisel võrgustikul (Joonis 8).

Kõige sobivamaks evolutsiooniliseks mudeliks osutus genotüübi G3 puhul Tamura-Nei nukleotiidi asendusmudel gamma-jaotusega (T93 + G) (Tamura ja Nei 1993).

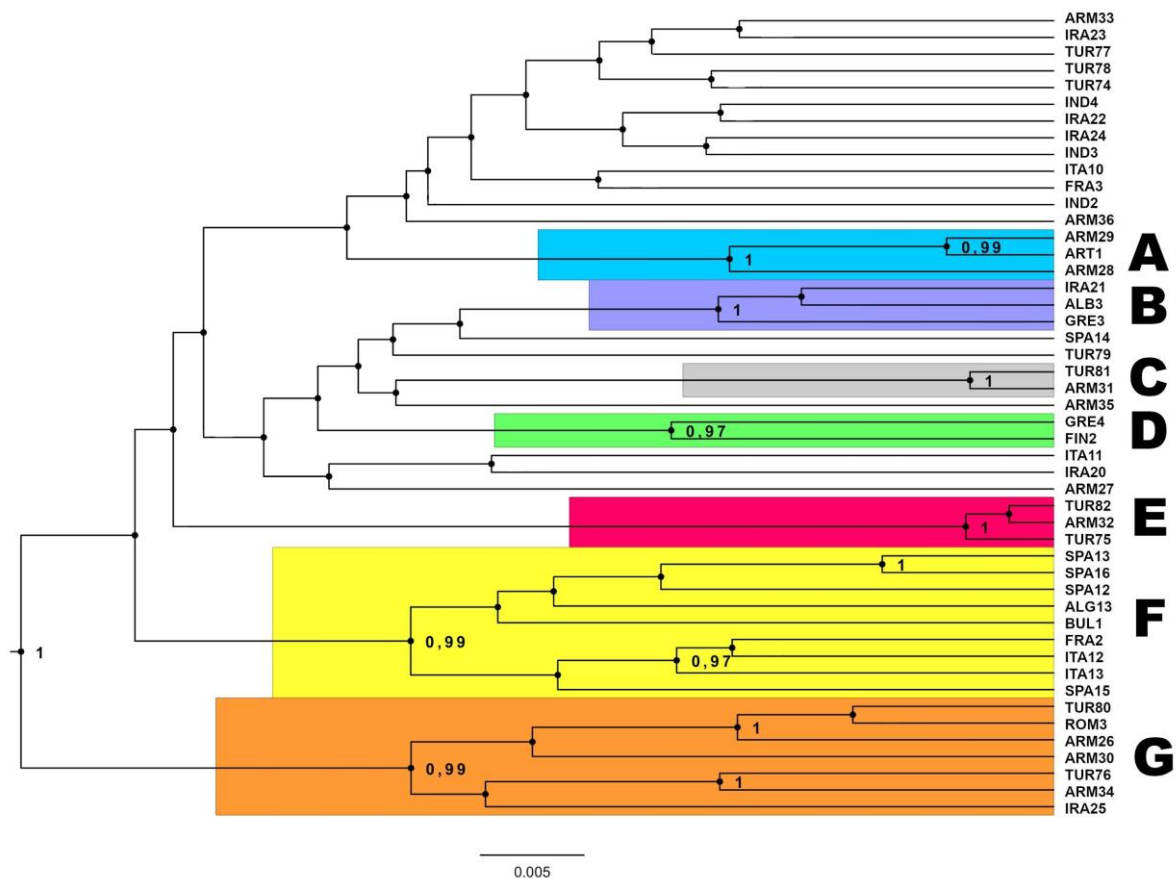
Proovid erinevatest geograafilistest piirkondadest asetsesid reeglina ühes haplogrupis, ning just G3 puhul on näha haplotüüpide selgemat geograafilist eristumist. Klaadi F kuuluvad proovid on Euroopa päritolu, kuid nende hulgas on ka üks Alžeerias pärit proov. Klaadis G on enamus proove Lähis-Ida piirkonnast, kuid üks haplotüüp on ka Rumeenia päritolu.

Klaadid A, C ja E moodustavad vaid Türgist ja Armeenias pärit haplotüübid, kusjuures haplotüübi ART1 moodustavatest genotüüpidest üks on selle töö käigus sekveneeritud Armeenia genotüüp ning teine varasemalt sekveneeritud Türki genotüüp.

Haplotüüpide mitmekesisus genotüübis on suhteliselt kõrge $H_d \approx 0,995$ (s.d. $\pm 0,005$). Nukleotiidide mitmekesisus (π) oli $0,00147$ (s.d. $\pm 0,00006$). Neutraalsusindeksitest Tajima D ja Fu olid negatiivsed ja mõlemad olid ka statistiliselt olulised. ($D = -2,549$, $p < 0,001$; $F_s = -25,65$, $p < 0,02$).



Joonis 8. *Echinococcus granulosus* sensu stricto genotüübi G3 (n=55) fülogeneetiline võrgustik. Haplotüüpe tähistavate ringide värvid on vastavuses erinevate geograafiliste regioonidega, musta värvi väiksemad ringid tähistavad mediaanvektoreid. Ringi sees olev number näitab mitu genotüüpi sellesse haplotüüpi kuulub, ilma numbrita haplotüüpides on neid vaid üks. Värviselt on ära toodud 7 klaadi, mille aposterioorne tõenäosus Bayesi fülogeneesipuul oli $>0,90$ (vt. Joonis 9).



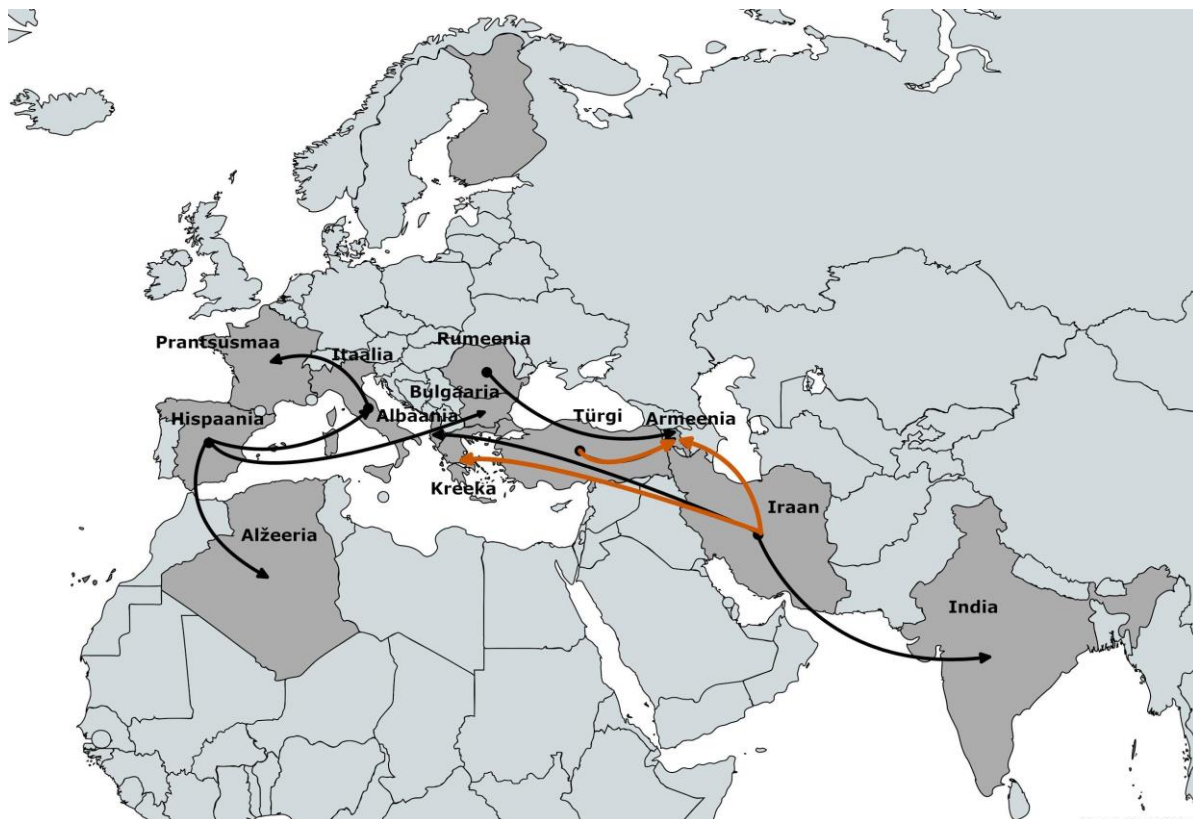
Joonis 9. *E. granulosus* sensu stricto 55 proovi põhjal koostatud genotüübi G3 Bayesi fülogeneetiline puu. Värviliselt on ära märgitud 7 klaadi, mille aposterioorne tõenäosus $>0,90$.

3.2.3. Genotüübi G3 levikusuunad

Genotüübi G3 proovid olid pärit 13 erinevast riigist. Bayesi fülogeograafilise analüüsi tulemusena leidsin 13 erineva piirkonna peale 10 erinevat levikuteed, mille Bayesi faktor (BF) oli üle kümne (Joonis 1). Bayesi faktori väärtust tõlgendatakse ühe hüpoteesi tõendite tugevusena teise üle. Kolme levikutee puhul oli $BF > 1000$ ja kolme puhul $BF > 100$. Bayesi faktori väärtuseid, mis on kolmest suuremad, peetakse hästi toetatuks.

Kolmest kõige tugevamalt toetatud levikuteedest kaks saavad alguse Iraanist ja üks Türgist. Nii Iraan kui ka Türgi on Armeenia proovide lähtekohtadeks. Iraanist läheb üks tugevalt toetatud levikutee veel Kreekasse. Kolm levikuteed, mille $BF > 100$ saavad alguse Euroopa eri osadest, üks Hispaaniast, üks Itaaliast ning üks Rumeeniast. Ka Rumeenia on nende andmete põhjal Armeenia proovide põlvnemiskohaks. Teised levikuteed olid

Hispaania ja Itaalia ning Itaalia ja Prantsusmaa vahel. Hispaaniat võib pidada ka Alžeeria ja Bulgaaria populatsioonide alguspunktiks. Iraanist läheb üks levikutee veel India poole.



Joonis 10. Bayesi fülogeograafilise analüüsi levikuteede kaart genotüübile G3. Oranžiga on märgitud levikuteed, mille puhul Bayesi faktor >1000 ning mustaga need, mille Bayesi faktor oli 10-1000. Tumedaga on märgitud kõik riigid, kust olid pärit analüüsi kaasatud proovid.

4. Arutelu

Põistang-paelussi *E. granulosus* s.s. mitokondriaalse DNA analüüsi põhjal võib kindlalt öelda, et genotüübid G1 ja G3 on üksteisest väga hästi eristatavad. Fülogeneetilise võrgustiku põhjal moodustus kaks eraldiseisvat haplogruppi, mis erinesid üksteisest 36 mutatsiooni võrra. Genotüüp G1 leviala on palju laiem ning esinemissagedus märkimisväärselt suurem genotüüp G3 omast. Vaid 19% minu sekveneeritud proovidest kuulus genotüüpi G3. Laiendatud andmekogumi puhul moodustasid genotüübi G3 proovid aga umbes 16% kõigist proovidest. Haplotüübi mitmekesisusindeks ja nukleotiidide mitmekesisus oli nii G1 kui G3 puhul kõrge, hoolimata nende esinemissageduste erinevustest. See viitab asjaolule, et parasiidid laiendavad introduktioonijärgselt oma leviala edukalt ka uutes piirkondades (Yanagida *et al.* 2012; Laurimäe *et al.* 2016).

G1 fülogeneetilise võrgustiku põhjal näeme, et põistang-paelussi geneetiline mitmekesisus on üle kogu maailma kõrge ning parasiidi levik pole geograafiliste piiridega takistatud. Erinevate piirkondade sarnasused võivad olla aga põhjustatud intensiivsest loomakaubandusest (Kinkar *et al.* 2016; Kinkar 2018). Genotüübi G3 põhjal koostatud fülogeneetilise puu põhjal näeme, et paljud monofüleetilised klaadid koosnevad lähipiirkondadest pärit proovidest. Kuigi üks suuremaid klaade F koosneb enamasti Euroopast pärit proovidest, on nende hulgas ka üks Alžeeria proov. Genotüüpide alampopulatsioonides pole märgata suurt geneetilist diferentseerumist ning eri piirkondadest pärit proovide paiknemine ühes klaadis on tõenäoliselt loomakaubanduse tagajärg.

Armeenia haplotüübid ei moodustanud üheski fülogeneetilises võrgustikus muudest piirkondadest eraldiseisvaid haplogruppe ning olid moodustunud klaadides alati koos Türgist pärit proovidega. G1 fülogeneetilise võrgustiku põhjal saame öelda, et Türgis on *E. granulosus* s.s. geneetiline mitmekesisus väga suur, kuid võttes arvesse proovide hulka, võivad Türgist pärit proovid olla andmestikus ülesindatud.

Bayesi fülogeograafiline analüüs tõi esile väga tugevalt toetatud levikuteed Lähis-Ida piirkonnas, mis viitavad G3 levikult Iraanist Kreekasse ja Armeeniasse ning Türgist Armeeniasse. Iraanist võis alguse saada ka parasiidi levik Albaaniasse ja Indiasse (Joonis 10). Iraanis on täheldatud ka teistest riikidest kõrgemat G3 esinemise tõenäosust (Sharbatkhori *et al.* 2011). Mitmed levikuteed saavad alguse ka Hispaaniast ning need

ilmestavad loomakaubanduse liikumist. Tegu on teise tööga, mis uurib just genotüübi G3 levikuteid ning suurem hulk Türgi ja Armeenia proove on mõjutanud levikuteede faktoreid Lähis- Idas. Eelnevalt oli teada, et tugevad levikuteed saavad alguse Türgist ning Iraanist (Kinkar *et al.* 2018b), käesolevas tööd Türgi roll kaugemaid piirkondi arvesse võttes justkui vähenes, kuid tugevad seosed lähiriikidega jäävad. Sarnased analüüsid genotüübiga G1 osutavad samuti Türgile kui leviku alguskohale (Kinkar 2018). Kokkuvõtvalt võib väita, et Türgi ja Lähis-Ida piirkond on põistang-paelussi leviku lähtekohaks, seda toetavad ka parasiidi seotus kariloomadega ning karjakasvatuse ajalugu (Kinkar *et al.* 2018a; Kinkar 2018).

Siiani kasutatakse *E. granulosus* s.s. leviku ja genotüübilise määramise uurimisel lühikesi mtDNA osasid, mis on põhjendatud liigi tuvastamiseks, kuid leviku mustrite uurimiseks on nende muutlikkus siiski liiga väike. Põistang-paelussi genotüüpide G1 ja G3 geneetiline mitmekesisus on suur ning selleks, et täpsemalt levikumustreid uurida, peaks analüüsides kasutama peaaegu täielikke mitogenoome. Genotüübi G3 puhul võiks lisada uuringutesse rohkem proove Indiast ning Iraani ja Türgi lähiümbrusest, antud töös esitatud järjestused Armeenias aitaksid kaasa piirkonnasisese levikumusti mõistmisele.

Kokkuvõte

Põistang-paeluss *Echinococcus granulosus* sensu stricto (s.s.) on ülemaailmse levikuga paeluss, kes põhjustab zoonootilist haigust nimega tsüstiline ehhinokokoos. See zoonoos kujutab ohtu nii kariloomade kui ka inimeste tervisele ning on paljudele riikidele majanduslikult suureks koormaks. *E. granulosus* s.s. jaguneb kaheks üksteisest hästieristuvaks genotüübiks: G1 ja G3.

Antud töös uuriti, kui palju erineb kahe lähestikku asuva piirkonna: Armeenia ja Türgi populatsioonide geneetiline struktuur võrreldes ülejäänud maailmaga ning kas sealsed populatsioonid moodustavad ka eraldiseisvaid klaade. Kokku sekveneeriti 85 proovi peaaegu täielikud mitokondriaalse DNA järjestused. Fülogeneetiliste analüüside läbiviimiseks lisati Armeenia (n=38) ja Türgi (n= 47) proovidele rahvusvahelisest andmebaasist Genbank 211 genotüüpi G1 ja 39 genotüüpi G3 kuuluvat peaaegu täielikku mtDNA järjestust (11 675 aluspaari).

Saadud andmestike põhjal nägime, et Armeenia ja Türgi proovid olid tihedalt seotud teistest piirkondadest pärit proovidega ning mõlema genotüübi puhul võis täheldada alampopulatsioonide vähest geneetilist diferentseerumist. Mõlema genotüübi puhul saab välja tuua väga kõrget geneetilist ja nukleotiidset mitmekesisust, kuid G3 pole ülemaailmselt nii laialt levinud ning tema esinemissagedus on G1 võrreldes palju väiksem. Antud andmestiku juures kuulus vaid 16% proovidest genotüüpi G3.

Genotüübi G3 põhjal sooritatud Bayesi fülogeograafilise analüüsi tulemusena tehti kindlaks genotüübi G3 kohta kümme tõenäolist levikuteed. Kolmest kõige tugevamalt toetatud levikuteest kaks said alguse Iraanist ning üks Türgist. Seega võime väita, et parasiidi leviku lähtepunkt asub Lähis-Ida piirkonnas.

Summary

Genetic diversity and phylogenetic relations of *Echinococcus granulosus* sensu stricto in Armenia and Turkey

Echinococcus granulosus sensu stricto is an internal parasite with a worldwide distribution. Tapeworms within the species complex cause a zoonotic disease called cystic echinococcosis. This zoonosis poses a threat to both livestock and human health and causes a substantial economic burden in many countries. *E. granulosus* s.s. is divided into two distinct genotypes: G1 and G3.

The aims of this thesis were to analyze the genetic structure of *Echinococcus granulosus* s.s. populations from two neighbouring countries, Armenia and Turkey, and to find out how much the populations differ from the rest of the world. A total of 85 near-complete mitochondrial DNA samples were sequenced. Additional sequences from Genbank were included to the resulting Armenian (n = 38) and Turkish (n = 47) samples to perform phylogenetic analyses. A total of 211 genotype G1 and 39 genotype G3 mtDNA sequences (11,675 bp) were added to the samples.

Based on the resulting data, it can be concluded that the Armenian and Turkish samples of both genotypes were closely related to samples from other regions, and in both cases, low genetic differentiation within subpopulations was observed. Both genotypes demonstrated very high genetic diversity, but genotype G3 is significantly less prevalent worldwide than G1. In given dataset only 16% of the samples belonged to the genotype G3.

As a result of Bayesian phylogeographic analysis based on genotype G3, ten well-supported diffusion routes were identified. Two of the three routes that received the BF value above 1000 originated from Iran and one from Turkey. Thus, we can claim that the potential origin for the spread of the parasite is in the Middle East region.

Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajat Urmas Saarmat nõuannete ja toetuse eest magistritöö valmimisel. Samuti tahaksin tänada erinevaid koostööpartnereid üle maailma, kelle saadetud materjalideta seda uurimistööd ei oleks saanud läbi viia. Siinkohal tänan ka Hripsime Atoyani, kellega koos alustasime Armeenia proovidega tegelemist. Tänan ka Sander Jõed, kelle IT-abita oleks paljud analüüsid kordades rohkem aega võtnud. Suured tänud perele ja sõpradele nende igakülgse toetuse eest.

Kasutatud kirjandus

- Alvarez Rojas, Cristian A., Thomas Romig, ja Marshall W. Lightowlers. 2014. „Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans – review of current knowledge“. *International Journal for Parasitology* 44 (1): 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.08.008>.
- Ayres, Daniel L., Aaron Darling, Derrick J. Zwickl, Peter Beerli, Mark T. Holder, Paul O. Lewis, John P. Huelsenbeck, et al. 2012. „BEAGLE: An Application Programming Interface and High-Performance Computing Library for Statistical Phylogenetics“. *Systematic Biology* 61 (1): 170–73. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syr100>.
- Bandelt, H. J., P. Forster, ja A. Röhl. 1999. „Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies.“ *Molecular Biology and Evolution* 16 (1): 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>.
- Bielejec, Filip, Guy Baele, Bram Vrancken, Marc A. Suchard, Andrew Rambaut, ja Philippe Lemey. 2016. „SpreaD3: Interactive Visualization of Spatiotemporal History and Trait Evolutionary Processes“. *Molecular Biology and Evolution* 33 (8): 2167–69. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw082>.
- Bielejec, Filip, Andrew Rambaut, Marc A. Suchard, ja Philippe Lemey. 2011. „SPREAD: Spatial Phylogenetic Reconstruction of Evolutionary Dynamics“. *Bioinformatics (Oxford, England)* 27 (20): 2910–12. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr481>.
- Bowles, J., ja D. P. Mcmanus. 1993. „NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus Echinococcus“. *International Journal for Parasitology* 23 (7): 969–72. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(93\)90065-7](https://doi.org/10.1016/0020-7519(93)90065-7).
- Bowles, Josephine, David Blair, ja Donald P. McManus. 1992. „Genetic variants within the genus Echinococcus identified by mitochondrial DNA sequencing“. *Molecular and Biochemical Parasitology* 54 (2): 165–73. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90109-W](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90109-W).
- Castro, J. A., A. Picornell, ja M. Ramon. 1998. „Mitochondrial DNA: A Tool for Populational Genetics Studies“. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 1 (4): 327–32.
- Deplazes, P., L. Rinaldi, C. A. Alvarez Rojas, P. R. Torgerson, M. F. Harandi, T. Romig, D. Antolova, et al. 2017. „Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis“. *Advances in Parasitology* 95: 315–493. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.11.001>.
- Drummond, Alexei J., ja Andrew Rambaut. 2007. „BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees“. *BMC Evolutionary Biology* 7 (1): 214. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214>.
- Eckert, J., M. A. Gemmell, François-Xavier Meslin, Z. S. Pawlowski, ja World Health Organization. 2001. *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals : A Public Health Problem of Global Concern*. Paris, France : World Organisation for Animal Health. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42427>.

- Eckert, J., ja R. C. A. Thompson. 2017. „Chapter One - Historical Aspects of Echinococcosis“. *Advances in Parasitology*, toimetanud R. C. A. Thompson, P. Deplazes, ja A. J. Lymbery, 95:1–64. and Echinococcosis, Part A. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.07.003>.
- FAO. 2014. *Multicriteria-Based Ranking for Risk Management of Food-Borne Parasites. Microbiological Risk Assessment Series (MRA) 23*. Microbiological Risk Assessment Series (FAO/WHO). Rome, Italy: FAO/WHO. www.fao.org/3/i3649e/I3649E.pdf.
- Gu, X., Y.-X. Fu, ja W.-H. Li. 1995. „Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites“. *Molecular Biology and Evolution* 12 (4): 546–57.
- Guindon, Stéphane, Jean-François Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijk, ja Olivier Gascuel. 2010. „New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0“. *Systematic Biology* 59 (3): 307–21. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- Hall, Thomas. 1999. „BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT“. *Nucleic Acids Symposium Series* 41 (jaanuar): 95–98. <https://doi.org/10.1021/bk-1999-0734.ch008>.
- Jenkins, David J. 2006. „Echinococcus granulosus in Australia, widespread and doing well!“ *Parasitology International*, Taeniasis/cysticercosis and echinococcosis with focus on Asia and the Pacific, 55 (jaanuar): S203–6. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.11.031>.
- Kinkar, Liina. 2018. „Global patterns of genetic diversity and phylogeography of Echinococcus granulosus sensu stricto – a tapeworm species of significant public health concern“. University of Tartu.
- Kinkar, Liina, Pasi K. Korhonen, Huimin Cai, Charles G. Gauci, Marshall W. Lightowlers, Urmas Saarma, David J. Jenkins, et al. 2019. „Long-read sequencing reveals a 4.4 kb tandem repeat region in the mitogenome of Echinococcus granulosus (sensu stricto) genotype G1“. *Parasites & Vectors* 12 (1): 238. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3492-x>.
- Kinkar, Liina, Teivi Laurimäe, Gerardo Acosta-Jamett, Vanessa Andresniuk, Ibrahim Balkaya, Adriano Casulli, Robin B. Gasser, et al. 2018. „Global phylogeography and genetic diversity of the zoonotic tapeworm Echinococcus granulosus sensu stricto genotype G1“. *International Journal for Parasitology* 48 (9): 729–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.03.006>.
- Kinkar, Liina, Teivi Laurimäe, Ibrahim Balkaya, Adriano Casulli, Houria Zait, Malik Irshadullah, Mitra Sharbatkhori, et al. 2018. „Genetic Diversity and Phylogeography of the Elusive, but Epidemiologically Important Echinococcus Granulosus Sensu Stricto Genotype G3“. *Parasitology* 145 (12): 1613–22. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000549>.
- Kinkar, Liina, Teivi Laurimäe, Mitra Sharbatkhori, Hossein Mirhendi, Eshrat Beigom Kia, Francisco Ponce-Gordo, Vanessa Andresniuk, et al. 2017. „New Mitogenome and Nuclear Evidence on the Phylogeny and Taxonomy of the Highly Zoonotic Tapeworm Echinococcus Granulosus Sensu Stricto“. *Infection*,

- Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 52: 52–58.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.04.023>.
- Kinkar, Liina, Teivi Laurimäe, Sami Simsek, Ibrahim Balkaya, Adriano Casulli, Maria Teresa Manfredi, Francisco Ponce-Gordo, et al. 2016. „High-Resolution Phylogeography of Zoonotic Tapeworm *Echinococcus Granulosus* Sensu Stricto Genotype G1 with an Emphasis on Its Distribution in Turkey, Italy and Spain“. *Parasitology* 143 (13): 1790–1801.
<https://doi.org/10.1017/S0031182016001530>.
- Lanfear, Robert, Brett Calcott, Simon Y. W. Ho, ja Stephane Guindon. 2012. „PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution Models for Phylogenetic Analyses“. *Molecular Biology and Evolution* 29 (6): 1695–1701. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss020>.
- Lanfear, Robert, Paul B. Frandsen, April M. Wright, Tereza Senfeld, ja Brett Calcott. 2017. „PartitionFinder 2: New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses“. *Molecular Biology and Evolution* 34 (3): 772–73. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>.
- Larrieu, Edmundo, Guillermo Mujica, Charles G. Gauci, Katherina Vizcaychipi, Marcos Seleiman, Eduardo Herrero, José Luis Labanchi, et al. 2015. „Pilot Field Trial of the EG95 Vaccine Against Ovine Cystic Echinococcosis in Rio Negro, Argentina: Second Study of Impact“. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9 (10): e0004134. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004134>.
- Laurimäe, Teivi. 2018. „Taxonomy and genetic diversity of zoonotic tapeworms in the species complex of *Echinococcus granulosus* sensu lato“. University of Tartu.
- Laurimäe, Teivi, Liina Kinkar, Vanessa Andresniuk, Karen Luisa Haag, Francisco Ponce-Gordo, Gerardo Acosta-Jamett, Teresa Garate, Luis Miguel González, ja Urmas Saarma. 2016. „Genetic diversity and phylogeography of highly zoonotic *Echinococcus granulosus* genotype G1 in the Americas (Argentina, Brazil, Chile and Mexico) based on 8279bp of mtDNA“. *Infection, Genetics and Evolution* 45 (november): 290–96. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.09.015>.
- Lemey, Philippe, Andrew Rambaut, Alexei J. Drummond, ja Marc A. Suchard. 2009. „Bayesian Phylogeography Finds Its Roots“. *PLoS Computational Biology* 5 (9): e1000520. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000520>.
- Lopez-Neyra CR and Soler Planas MA (1943) Revision del genero *Echinococcus* Rud y descripcion de una especie nueva pararita intestinal del perro en Almeria. *Revista ibérica de parasitología* 3, 169–194.
- McManus, Donald P, Wenbao Zhang, Jun Li, ja Paul B Bartley. 2003. „Echinococcosis“. *The Lancet* 362 (9392): 1295–1304.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14573-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14573-4).
- Moro, Pedro, ja Peter M. Schantz. 2006. „Cystic echinococcosis in the Americas“. *Parasitology International*, Taeniasis/cysticercosis and echinococcosis with focus on Asia and the Pacific, 55 (jaanuar): S181–86.
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.11.048>.

- Otero-Abad, Belen, ja Paul R. Torgerson. 2013. „A Systematic Review of the Epidemiology of Echinococcosis in Domestic and Wild Animals“. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7 (6): e2249. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002249>.
- Rambaut, Andrew, Alexei J. Drummond, Dong Xie, Guy Baele, ja Marc A. Suchard. 2018. „Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7“. *Systematic Biology* 67 (5): 901–4. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>.
- Romig, T., P. Deplazes, D. Jenkins, P. Giraudoux, A. Massolo, P. S. Craig, M. Wassermann, K. Takahashi, ja M. de la Rue. 2017. „Chapter Five - Ecology and Life Cycle Patterns of Echinococcus Species“. *Advances in Parasitology*, toimetanud R. C. A. Thompson, P. Deplazes, ja A. J. Lymbery, 95:213–314. and Echinococcosis, Part A. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.11.002>.
- Rozas, Julio. 2009. „DNA Sequence Polymorphism Analysis Using DnaSP“. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 537: 337–50. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-251-9_17.
- Scott, J. C., J. Stefaniak, Z. S. Pawlowski, ja D. P. McMANUS. 1997. „Molecular Genetic Analysis of Human Cystic Hydatid Cases from Poland: Identification of a New Genotypic Group (G9) of Echinococcus Granulosus“. *Parasitology* 114 (1): 37–43.
- Sharbatkhori, Mitra, Majid Fasihi Harandi, Hossein Mirhendi, Elham Hajjalilo, ja Eshrat Beigom Kia. 2011. „Sequence Analysis of Cox1 and Nad1 Genes in Echinococcus Granulosus G3 Genotype in Camels (Camelus Dromedarius) from Central Iran“. *Parasitology Research* 108 (3): 521–27. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2092-7>.
- Suchard, Marc A., Philippe Lemey, Guy Baele, Daniel L. Ayres, Alexei J. Drummond, ja Andrew Rambaut. 2018. „Bayesian Phylogenetic and Phylodynamic Data Integration Using BEAST 1.10“. *Virus Evolution* 4 (1). <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>.
- Suchard, Marc A., ja Andrew Rambaut. 2009. „Many-Core Algorithms for Statistical Phylogenetics“. *Bioinformatics* 25 (11): 1370–76. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp244>.
- Tamura, K., ja M. Nei. 1993. „Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees“. *Molecular Biology and Evolution* 10 (3): 512–26. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>.
- Thevenet, Paula Sánchez, Oscar Jensen, Ricardo Drut, Gloria E. Cerrone, María S. Grenóvero, Héctor M. Alvarez, Héctor M. Targovnik, ja Juan A. Basualdo. 2005. „Viability and infectiousness of eggs of Echinococcus granulosus aged under natural conditions of inferior arid climate“. *Veterinary Parasitology* 133 (1): 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.048>.

- Thompson, R. C. A. 2017. „Chapter Two - Biology and Systematics of Echinococcus“. *Advances in Parasitology*, toimetanud R. C. A. Thompson, P. Deplazes, ja A. J. Lymbery, 95:65–109. and Echinococcosis, Part A. Academic Press.
https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.07.001.
- Thompson, R. C. Andrew, ja Donald P. McManus. 2002. „Towards a taxonomic revision of the genus Echinococcus“. *Trends in Parasitology* 18 (10): 452–57.
https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02358-9.
- Yanagida, Tetsuya, Tahereh Mohammadzadeh, Shaden Kamhawi, Minoru Nakao, Seyed Mahmoud Sadjjadi, Nawal Hijjawi, Sami K. Abdel-Hafez, Yasuhito Sako, Munehiro Okamoto, ja Akira Ito. 2012. „Genetic polymorphisms of Echinococcus granulosus sensu stricto in the Middle East“. *Parasitology International* 61 (4): 599–603. https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.05.014.

Internetiallikad:

1. CodonCode Corporation, www.codoncode.com
2. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
3. http://beast.community/workshop_discrete_diffusion

Lisa 1.

Antud uurimuses sekveneeritud 85 Armeenia ja Türgi proovide haplotüübi vastavus laborikoodidele.

Haplotüüp	Laborikood	Peremeesliik	Riik	Genotüüp
A1	Arm1	lammas	Armeenia	G1
A6	Arm11	lammas	Armeenia	G1
A7	Arm12	veis	Armeenia	G1
A6	Arm13	lammas	Armeenia	G1
A8	Arm14	lammas	Armeenia	G1
A9	Arm15	lammas	Armeenia	G1
A10	Arm16	inimene	Armeenia	G3
A11	Arm17	inimene	Armeenia	G3
A12	Arm18	inimene	Armeenia	G3
A13	Arm19	lammas	Armeenia	G1
A2	Arm2	lammas	Armeenia	G1
A14	Arm22	inimene	Armeenia	G3
A15	Arm23	inimene	Armeenia	G3
A16	Arm24	veis	Armeenia	G3
A17	Arm25	veis	Armeenia	G3
A18	Arm26	lammas	Armeenia	G3
A19	Arm27	lammas	Armeenia	G3
A20	Arm28	lammas	Armeenia	G3
A21	Arm29	lammas	Armeenia	G1
A3	Arm3	inimene	Armeenia	G1
A22	Arm30	inimene	Armeenia	G1
A23	Arm31	veis	Armeenia	G1
A24	Arm32	inimene	Armeenia	G1
A25	Arm33	veis	Armeenia	G1
A26	Arm35	inimene	Armeenia	G1
A27	Arm40	veis	Armeenia	G1
A28	Arm41	lammas	Armeenia	G1
A29	Arm42	veis	Armeenia	G1
A30	Arm43	veis	Armeenia	G1
A31	Arm44	lammas	Armeenia	G3
A32	Arm45	lammas	Armeenia	G1
A33	Arm46	lammas	Armeenia	G1
A34	Arm47	lammas	Armeenia	G3
A35	Arm48	lammas	Armeenia	G1
A36	Arm49	lammas	Armeenia	G1
A4	Arm5	inimene	Armeenia	G1
A37	Arm50	lammas	Armeenia	G1
A5	Arm8	inimene	Armeenia	G1

T1	E2	veis	Türgi	G3
T2	E3	veis	Türgi	G1
T3	E4	veis	Türgi	G1
T4	H1	veis	Türgi	G1
T9	H11	lammas	Türgi	G1
T10	H12	veis	Türgi	G1
T16	H13	veis	Türgi	G1
T11	H14	veis	Türgi	G1
T12	H15	veis	Türgi	G1
T15	H16	lammas	Türgi	G1
T5	H2	veis	Türgi	G1
T13	H20	lammas	Türgi	G1
T19	H22	veis	Türgi	G1
T14	H24	veis	Türgi	G1
T35	H25	lammas	Türgi	G1
T20	H29	veis	Türgi	G1
T17	H32	lammas	Türgi	G1
T21	H34	veis	Türgi	G1
T22	H36	veis	Türgi	G1
T24	H37	lammas	Türgi	G3
T23	H38	veis	Türgi	G1
T18	H39	lammas	Türgi	G1
T26	H41	lammas	Türgi	G1
T34	H42	lammas	Türgi	G1
T25	H43	lammas	Türgi	G1
T1	H44	lammas	Türgi	G3
T3	H46	lammas	Türgi	G1
T34	H47	lammas	Türgi	G1
T28	H48	lammas	Türgi	G1
T29	H49	lammas	Türgi	G1
T6	H5	veis	Türgi	G1
T30	H50	lammas	Türgi	G1
T27	H51	lammas	Türgi	G1
T31	H53	lammas	Türgi	G1
T32	H55	lammas	Türgi	G1
T9	H56	lammas	Türgi	G1
T15	H57	lammas	Türgi	G1
T35	H59	lammas	Türgi	G1
T33	H60	lammas	Türgi	G1
T14	H7	veis	Türgi	G1
T7	H8	veis	Türgi	G1
T8	H9	veis	Türgi	G1
T36	T1	inimene	Türgi	G1
T40	T10	inimene	Türgi	G1

T37	T2	inimene	Türgi	G1
T38	T4	inimene	Türgi	G1
T39	T6	inimene	Türgi	G3

Lisa 2

Laiendatud andmekogumis asuvad proovid (n=335).

Genotüüp G1

Haplotüüp	Laborikood	Peremeesliik	Riik
GRE1	V8	lammas	Kreeka
GRE1	VA16	lammas	Kreeka
ROM1	HS4	veis	Rumeenia
FIN1	Fin16	inimene	Soome
ITA1	IT3	veis	Itaalia
ITA2	IT10	veis	Itaalia
ITA3	HIP9	inimene	Itaalia
ITA4	AC3	lammas	Itaalia
ITA4	AC4	lammas	Itaalia
SPA1	2G	inimene	Hispaania
ROM2	7G	inimene	Rumeenia
SPA2	12G	metssiga	Hispaania
ALB1	ALB3	lammas	Albaania
ALB2	ALB4	lammas	Albaania
MOR1	4150	veis	Maroko
FRA1	5455	veis	Prantsusmaa
MOL1	6200	lammas	Moldova
MOL2	6214	veis	Moldova
MOL3	6187	lammas	Moldova
SPA3	P2	lammas	Hispaania
SPA4	P3	lammas	Hispaania
SPA4	P4	lammas	Hispaania
SPA5	P15	lammas	Hispaania
SPA6	P16	lammas	Hispaania
SPA7	P21	lammas	Hispaania
SPA8	P47	sig	Hispaania
SPA9	P51	kits	Hispaania
SPA9	P53	kits	Hispaania
SPA10	P52	kits	Hispaania
SPA11	P61	inimene	Hispaania
TUN1	U3	lammas	Tuneesia
TUN2	U8	lammas	Tuneesia
TUN3	U11	lammas	Tuneesia
TUN4	U17	lammas	Tuneesia
TUN5	U30	lammas	Tuneesia
TUN5	OU15	inimene	Tuneesia
TUN5	OU18	inimene	Tuneesia
TUN6	U32	lammas	Tuneesia

TUN7	U33	lammas	Tuneesia
TUN8	U44	lammas	Tuneesia
TUN8	U57	lammas	Tuneesia
TUN9	U62	lammas	Tuneesia
TUN10	U66	lammas	Tuneesia
TUN10	U80	lammas	Tuneesia
TUN11	U82	lammas	Tuneesia
TUN12	U110	lammas	Tuneesia
TUN13	U117	lammas	Tuneesia
TUN14	U118	lammas	Tuneesia
TUN14	U141	veis	Tuneesia
TUN15	U120	lammas	Tuneesia
TUN15	OU10	inimene	Tuneesia
TUN16	U154	veis	Tuneesia
TUN17	U167	veis	Tuneesia
TUN17	U183	veis	Tuneesia
TUR1	S1	lammas	Türgi
TUR1	S7	lammas	Türgi
TUR1	S12	lammas	Türgi
TUR2	S2	lammas	Türgi
TUR3	S9	lammas	Türgi
TUR3	S15	lammas	Türgi
TUR3	S16	lammas	Türgi
TUR4	S13	lammas	Türgi
TUR5	S14	lammas	Türgi
TUR6	S19	veis	Türgi
TUR7	S20	veis	Türgi
TUR8	S30	veis	Türgi
TUR9	S31	veis	Türgi
TUR10	S33	veis	Türgi
TUR11	S53	veis	Türgi
TUR12	S69	veis	Türgi
TUR13	S77	veis	Türgi
TUR14	S78	veis	Türgi
TUR15	S83	veis	Türgi
TUR16	S91	veis	Türgi
TUR17	S99	veis	Türgi
TUR17	S120	lammas	Türgi
TUR18	S104	veis	Türgi
TUR19	S107	lammas	Türgi
TUR20	S109	lammas	Türgi
TUR20	S148	lammas	Türgi
TUR21	S111	lammas	Türgi
TUR22	S112	lammas	Türgi

TUR23	S117	lammas	Türgi
TUR24	S119	lammas	Türgi
TUR25	S121	lammas	Türgi
TUR26	S124	lammas	Türgi
TUR27	S129	lammas	Türgi
TUR28	S135	lammas	Türgi
TUR29	S136	lammas	Türgi
TUR30	S138	lammas	Türgi
TUR31	S141	lammas	Türgi
TUR32	S142	lammas	Türgi
TUR33	S144	lammas	Türgi
TUR34	S146	lammas	Türgi
TUR35	S149	veis	Türgi
TUR36	S154	lammas	Türgi
ARB1	A1	veis	Argentiina
ARB1	A23	lammas	Argentiina
ARB1	A24	lammas	Argentiina
ARB1	A29	lammas	Argentiina
ARB1	A30	lammas	Argentiina
ARB1	A37	veis	Argentiina
ARB1	A47	lammas	Argentiina
ARB1	A50	lammas	Argentiina
ARB1	A52	lammas	Argentiina
ARB1	A53	lammas	Argentiina
ARB1	A54	lammas	Argentiina
ARB1	A55	lammas	Argentiina
ARB1	H433	veis	Brasiilia
ARB1	P68	veis	Argentiina
ARG1	A2	veis	Argentiina
ARG2	A10	sig	Argentiina
ARG3	A13	veis	Argentiina
ARG4	A17	lammas	Argentiina
ARG5	A19	lammas	Argentiina
ARG6	A21	lammas	Argentiina
ARB2	A35	veis	Argentiina
ARB2	H567	veis	Brasiilia
ARG7	A40	veis	Argentiina
ARG8	A41	veis	Argentiina
ARG9	A42	veis	Argentiina
ARG10	A43	veis	Argentiina
ARG11	A57	lammas	Argentiina
CHI1	TS6	veis	Tšiili
CHI1	TS14	veis	Tšiili
CHI2	TS13	veis	Tšiili

CHI2	TS18	veis	Tšiili
CHI3	TS15	veis	Tšiili
CHI4	TS16	veis	Tšiili
BRA2	H172	veis	Brasiilia
BRA3	H369	veis	Brasiilia
BRA4	H404	veis	Brasiilia
BRA1	H408	veis	Brasiilia
BRA1	H429	veis	Brasiilia
BRA1	H585	veis	Brasiilia
BRA6	H424	veis	Brasiilia
BRA7	H439	veis	Brasiilia
BRA8	H440	veis	Brasiilia
BRA9	H442	veis	Brasiilia
BRA10	H574	veis	Brasiilia
BRA5	H575	veis	Brasiilia
IRA1	IR11	lammas	Iraan
IRA1	IR12	lammas	Iraan
IRA1	IR14	lammas	Iraan
IRA4	IR13	lammas	Iraan
IRA5	IR17	lammas	Iraan
IRA6	IR18	lammas	Iraan
IRA7	IR19	lammas	Iraan
IRA8	IR21	lammas	Iraan
IRA2	IR22	lammas	Iraan
IRA2	IR23	lammas	Iraan
IRA9	IR24	lammas	Iraan
IRA10	IR27	lammas	Iraan
IRA11	IR29	lammas	Iraan
IRA12	IR31	lammas	Iraan
IRA13	IR32	lammas	Iraan
IRA14	IR33	lammas	Iraan
IRA15	IR35	kits	Iraan
IRA3	IR46	inimene	Iraan
IRA3	IR47	inimene	Iraan
IRA16	IR49	veis	Iraan
IRA17	IR51	veis	Iraan
IRA18	IR52	veis	Iraan
ARG12	P66	veis	Argentiina
ARG13	P67	veis	Argentiina
ARG14	P69	veis	Argentiina
ARG15	P70	veis	Argentiina
ARG16	P76	lammas	Argentiina
MON2	J86	inimene	Mongoolia
MON1	J88	inimene	Mongoolia

MON1	J91	inimene	Mongoolia
IRA19	N1	kits	Iraan
KAZ1	B20	inimene	Kasahstan
ARG17	SO212	lammas	Argentiina
MEX1	8G	sig	Mehhiko
IND1	MI2	pühvel	India
AUS1	J1	dingo	Austraalia
AUS2	J2	dingo	Austraalia
AUS3	J3	dingo	Austraalia
TUN18	OU2	inimene	Tuneesia
TUN19	OU3	inimene	Tuneesia
TUN20	OU5	inimene	Tuneesia
TUN20	OU6	inimene	Tuneesia
TUN21	OU7	inimene	Tuneesia
TUN22	OU9	inimene	Tuneesia
TUN23	OU12	inimene	Tuneesia
TUN24	OU13	inimene	Tuneesia
TUN25	OU14	inimene	Tuneesia
TUN26	OU16	inimene	Tuneesia
TUN27	OU17	inimene	Tuneesia
TUN28	OU20	inimene	Tuneesia
TUN29	OU21	inimene	Tuneesia
TUN30	OU23	inimene	Tuneesia
ITA5	VA1	kits	Itaalia
ITA6	VA3	lammas	Itaalia
ITA7	VA6	lammas	Itaalia
ITA8	VA7	lammas	Itaalia
ITA9	VA14	lammas	Itaalia
GRE2	VA17	lammas	Kreeka
ALG1	ZA11	inimene	Alžeeria
ALG2	ZA12	inimene	Alžeeria
ALG3	ZA13	inimene	Alžeeria
ALG4	ZA20	inimene	Alžeeria
ALG5	ZA23	inimene	Alžeeria
ALG6	ZA24	inimene	Alžeeria
ALG7	ZA25	inimene	Alžeeria
ALG8	ZA26	inimene	Alžeeria
ALG9	ZA27	inimene	Alžeeria
ALG10	ZA31	inimene	Alžeeria
ALG11	ZA32	inimene	Alžeeria
ALG12	ZA34	inimene	Alžeeria
ARM1	Arm1	lammas	Armeenia
ARM6	Arm11	lammas	Armeenia
ARM6	Arm13	lammas	Armeenia

ARM7	Arm12	veis	Armeenia
ARM8	Arm14	lammas	Armeenia
ARM9	Arm15	lammas	Armeenia
ARM2	Arm2	lammas	Armeenia
ARM11	Arm29	lammas	Armeenia
ARM3	Arm3	inimene	Armeenia
ARM12	Arm30	inimene	Armeenia
ARM13	Arm31	veis	Armeenia
ARM14	Arm32	inimene	Armeenia
ARM16	Arm35	inimene	Armeenia
ARM17	Arm40	veis	Armeenia
ARM18	Arm41	lammas	Armeenia
ARM19	Arm42	veis	Armeenia
ARM20	Arm43	veis	Armeenia
ARM21	Arm45	lammas	Armeenia
ARM22	Arm46	lammas	Armeenia
ARM23	Arm48	lammas	Armeenia
ARM24	Arm49	lammas	Armeenia
ARM4	Arm5	inimene	Armeenia
ARM25	Arm50	lammas	Armeenia
ARM5	Arm8	inimene	Armeenia
ARM15	Arm33	veis	Armeenia
ARM10	Arm19	lammas	Armeenia
TUR37	E3	veis	Türgi
TUR38	E4	veis	Türgi
TUR38	H46	lammas	Türgi
TUR39	H1	veis	Türgi
TUR40	H11	lammas	Türgi
TUR40	H56	lammas	Türgi
TUR41	H12	veis	Türgi
TUR42	H13	veis	Türgi
TUR43	H14	veis	Türgi
TUR44	H15	veis	Türgi
TUR45	H16	lammas	Türgi
TUR45	H57	lammas	Türgi
TUR46	H2	veis	Türgi
TUR47	H20	lammas	Türgi
TUR48	H24	veis	Türgi
TUR48	H7	veis	Türgi
TUR49	H25	lammas	Türgi
TUR49	H59	lammas	Türgi
TUR50	H22	veis	Türgi
TUR51	H29	veis	Türgi
TUR52	H32	lammas	Türgi

TUR53	H34	veis	Türgi
TUR54	H36	veis	Türgi
TUR55	H38	veis	Türgi
TUR56	H39	lammas	Türgi
TUR57	H41	lammas	Türgi
TUR58	H42	lammas	Türgi
TUR58	H47	lammas	Türgi
TUR59	H43	lammas	Türgi
TUR60	H48	lammas	Türgi
TUR61	H49	lammas	Türgi
TUR62	H5	veis	Türgi
TUR63	H50	lammas	Türgi
TUR64	H51	lammas	Türgi
TUR65	H53	lammas	Türgi
TUR66	H55	lammas	Türgi
TUR67	H60	lammas	Türgi
TUR68	H8	veis	Türgi
TUR69	H9	veis	Türgi
TUR70	T1	inimene	Türgi
TUR71	T10	inimene	Türgi
TUR72	T2	inimene	Türgi
TUR73	T4	inimene	Türgi

Genotüüp G3

Haplotüüp	Laborikood	Peremeesliik	Riik
UR74	T6	inimene	Türgi
FIN2	Fin13	inimene	Soome
BUL1	HB10	inimene	Bulgaaria
ALB3	ALB1	veis	Albaania
IRA20	N3	lammas	Iraan
ROM3	B12	inimene	Rumeenia
ITA11	V7	lammas	Itaalia
ITA10	V13	lammas	Itaalia
FRA2	4902	lammas	Prantsusmaa
FRA2	4895	lammas	Prantsusmaa
FRA3	6565	lammas	Prantsusmaa
ITA12	VA5	lammas	Itaalia
ITA13	VA8	lammas	Itaalia
GRE3	VA18	lammas	Kreeka
GRE4	VA19	lammas	Kreeka
SPA13	P5	lammas	Hispaania
SPA14	P8	lammas	Hispaania

SPA15	P11	lammas	Hispaania
SPA12	P17	lammas	Hispaania
SPA12	P18	lammas	Hispaania
SPA12	P19	lammas	Hispaania
SPA16	P63	inimene	Hispaania
TUR75	S52	veis	Türgi
TUR76	S75	veis	Türgi
TUR77	S82	veis	Türgi
ART1	S84	veis	Türgi
ART1	Arm18	inimene	Armeenia
TUR78	S127	lammas	Türgi
TUR79	S131	lammas	Türgi
TUR79	S137	lammas	Türgi
TUR80	S145	lammas	Türgi
IRA21	IR28	lammas	Iraan
IRA22	IR37	kaamel	Iraan
IRA23	IR38	kaamel	Iraan
IRA24	IR43	kaamel	Iraan
IRA25	IR44	kaamel	Iraan
IND2	MI3	pühvel	India
IND3	MI6	pühvel	India
IND4	MI21	pühvel	India
IND4	MI22	pühvel	India
ALG13	ZA41	inimene	Alžeeria
ARM26	Arm44	lammas	Armeenia
TUR81	E2	veis	Türgi
TUR81	H44	lammas	Türgi
TUR82	H37	lammas	Türgi
ARM27	Arm47	lammas	Armeenia
ARM28	Arm16	inimene	Armeenia
ARM29	Arm17	inimene	Armeenia
ARM30	Arm22	inimene	Armeenia
ARM31	Arm23	inimene	Armeenia
ARM32	Arm24	veis	Armeenia
ARM33	Arm25	veis	Armeenia
ARM34	Arm26	lammas	Armeenia
ARM35	Arm27	lammas	Armeenia
ARM36	Arm28	lammas	Armeenia

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Maris Pärn,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose
Pöistang-paelussi *Echinococcus granulosus* sensu stricto geneetiline mitmekesisus
Armeenias ja Türgis ning fülogeneetiline seos teiste piirkondadega,
mille juhendaja on Urmas Saarma,
reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace
kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele
kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu
Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost
reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja
kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi
ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Maris Pärn

24.05.2019